



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATALISIS

**EFFECTO DEL CO₂ SOBRE EL CRECIMIENTO Y
COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Neochloris
oleoabundans* CULTIVADA EN
FOTOBIORREACTORES**

TESIS

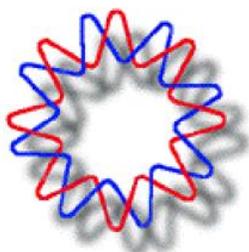
PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

QUE PRESENTA

IBQ. GRACIELA MITSUE LEÓN SAIKI

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Alfredo Martínez Jiménez





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Alfredo Martínez Jiménez en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para la realización del mismo se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca CONACyT No. 240043 y de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del proyecto DGAPA/PAPIIT/UNAM IT200312-2.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Omar Homero Pantoja Ayala

Instituto de Biotecnología/UNAM

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Instituto de Biotecnología/UNAM

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Instituto de Biotecnología/UNAM

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente

Dr. Agustín López-Munguía Canales

Secretario

Dr. Marcela Ayala Aceves

Vocal

Dr. María Esperanza Martínez Romero

Suplente

Dr. Rosario Vera Estrella

Suplente

Dr. Humberto Flores Soto

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, porque nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. ¡Los quiero, ustedes son mi inspiración!

A mis padres adoptivos, mis tíos Takeshi y Lupita por haberme adoptado como su hija, por cuidarme, estar al pendiente y ayudarme durante estos dos años y medio.

A esa maravillosa familia que la vida me dio: mis hermanos, mis tíos y mis primos, por su apoyo incondicional y motivación siempre que la necesité.

Al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por aceptarme en su grupo de trabajo y por estar siempre disponible para resolver mis dudas y escuchar mis opiniones.

A Male y a sus hijos por recibirme siempre con los brazos abiertos.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Omar Pantoja y Dr. Leobardo Serrano, por sus comentarios que siempre aportaron algo al proyecto y a mi formación.

A los miembros del jurado por los comentarios y sugerencias con respecto a la tesis.

Al Dr. Ezequiel Franco Lara por su apoyo antes y durante la realización de la estancia en el Instituto de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Técnica de Braunschweig, Alemania (Institut für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität Braunschweig). Así como a Georg y Florian por el apoyo con los experimentos y análisis de resultados realizados en dicho instituto.

A la M en C Adriana Garibay Hernández por todas sus enseñanzas sobre el maravilloso mundo de las microalgas. Por ser paciente y ayudarme siempre que lo necesité.

Al Biólogo Mario Alberto Caro B. por su ayuda con la operación de los equipos en la planta piloto, así como en la adecuación, instalación y operación de los fotobiorreactores. Además, por su amistad y apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Al Ing. Dusstthon Llorente por el apoyo en el desarrollo, diseño, construcción e instrumentación de los fotobiorreactores utilizados en este trabajo.

A Mercedes Enzaldo (Mechita) y Aurelia González (Aure) por todo el apoyo brindado en mi trabajo. Ustedes son una parte muy importante del laboratorio.

A esas personas especiales que me apoyaron en mis ratos de angustia, desespero y tristeza. Pero que también estuvieron ahí para compartir mis alegrías y logros. ¡Muchas gracias, amigos!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Biodiesel	7
2.1.1 Métodos de producción de biodiesel	7
2.1.2 Propiedades del biodiesel como biocombustible	8
2.2 Aceites vegetales como materia prima	9
2.3 Microalgas oleaginosas como materia prima alterna	12
2.4 <i>Neochloris oleoabundans</i>	14
2.5 Sistemas de producción de microalgas	16
2.5.1 Sistemas cerrados: Fotobiorreactores	16
2.5.2 Sistemas abiertos: estanques tipo circuito	17
2.6 Suplemento de CO ₂	18
2.6.1 Efecto del CO ₂ en el pH	19
2.6.2 Mecanismo de concentración de CO ₂ y anhidrasa carbónica	21
2.7 Escalamiento y sus dificultades	23
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Microorganismo	28
5.2 Medio Basal de Bold (BBM)	28
5.3 Pre-inóculos e inóculos	29
5.4 Fotobiorreactores (FBR)	29

5.4.1 FBR de tanque agitado	29
5.4.1.1 FBR 1L	29
5.4.1.2 FBR 11 L	31
5.4.2 Columna de burbujeo	32
5.5 Diseño experimental	33
5.6 Métodos analíticos	35
5.6.1 Densidad celular	35
5.6.2 Peso seco	36
5.6.3 Extracción y determinación de lípidos totales	36
5.6.4 Extracción y derivatización de ácidos grasos	37
5.6.5 Determinación de carbohidratos y proteínas	37
5.6.6 Contenido de pigmentos: clorofila y carotenoides	38
5.6.7 Citometría de flujo	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Evaluación del flujo molar de CO ₂ en un FBR de 1 L	40
6.1.1 Efecto en el crecimiento	40
6.1.2 Efecto en la producción y productividad de masa celular o peso seco	43
6.1.3 Efecto en la producción y productividad de lípidos	44
6.1.4 Efecto en el perfil de ácidos grasos	47
6.1.5 Potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos de <i>N. oleoabundans</i>	47
6.1.6 Efecto en la producción y productividad de carbohidratos	48
6.1.7 Efecto en la producción y productividad de proteínas	48
6.1.8 Efecto en la producción y productividad de pigmentos	49
6.2 Análisis de resultados del diseño experimental hexagonal y modelos de predicción	51
6.2.1 Masa celular	52
6.2.2 Contenido celular de lípidos	53
6.3 Evaluación del porcentaje de CO ₂ sobre el crecimiento de <i>N. oleoabundans</i>	56
6.4 Evaluación del efecto del CO ₂ en un tanque agitado de 11 L	58
6.4.1 Efecto en el crecimiento	58

6.4.2 Efecto en el contenido de lípidos estimado por citometría de flujo	59
6.5 Evaluación del efecto del CO ₂ en una columna de burbujeo	60
6.5.1 Efecto sobre el crecimiento	60
6.5.2 Efecto sobre la composición bioquímica	61
7. CONCLUSIONES	64
8. PERSPECTIVAS	65
9. BIBLIOGRAFÍA	66
10. APÉNDICE	74
10.1 Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación	74
10.2 Densidad celular	74
10.3 Producción	75
10.4 Productividad	75
10.5 Flujo molar de CO ₂	75
10.6 Cinéticas de oxígeno disuelto	76
10.7 Cinéticas de CO ₂ disuelto	76
10.8 Comparación de los resultados obtenidos con reportes en la literatura	77
10.9 Comparación de la densidad celular alcanzada a 25 y 29 °C	79
10.10 Resumen del trabajo aceptado para su presentación en la modalidad de cartel en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y, con el cual, se obtuvo el premio al mejor cartel expuesto el 23 de Junio de 2011	79

ÍNDICE DE TABLAS

1	Norma ASTM D 6751 (ASTM: American Society for Testing and Materials) y EN 14214 para el biodiesel en EUA y Europa, respectivamente	9
2	Comparación entre algunas fuentes de biodiesel para cubrir el 50% del combustible necesario para el transporte en los EUA	11
3	Contenido lipídico y productividades de diferentes especies de microalgas	13
4	Comparación de los sistemas abiertos y cerrados para el cultivo de microalgas	17
5	Reacciones biológicas que afectan el pH	21
6	Soluciones estándar para la preparación del medio BBM	28
7	Geometría de los fotobiorreactores	30
8	Puntos del diseño experimental hexagonal	35
9	Efecto del flujo molar de CO ₂ sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) de <i>N. oleoabundans</i>	42
10	Perfil de ácidos grasos (en porcentaje del total) bajo la condición de 0.1701 mmol CO ₂ /L/min	46
11	Análisis de varianza del efecto del porcentaje de CO ₂ y el flujo total de gas en la masa celular final (pg/cél)	53
12	Análisis de varianza del efecto del porcentaje de CO ₂ y el flujo total de gas sobre el contenido lipídico final (pg/cél)	55
13	Resultados del efecto del CO ₂ sobre la biomasa de cultivos de <i>N. oleoabundans</i> (0.5 vvm, 25 °C, pH 7)	57
14	Valores promedio del citómetro de flujo en el día 7 de cultivo	60

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Transesterificación de aceite a biodiesel. R ₁₋₃ son grupos hidrocarbonados	8
2	Efecto del pH en la distribución de las especies de carbono inorgánico	20
3	FBR de 1L	30
4	FBR de 11L	32
5	Columna de burbujeo	33
6	Puntos de diseño para el hexágono	34
7	Correlación entre la fluorescencia RN y el contenido celular de lípidos	39
8	Efecto del flujo molar de CO ₂ sobre el número de células. A) Crecimiento en términos de número de células durante los 7 días de cultivo. Las gráficas corresponden al flujo molar en mmol CO ₂ /L/min. B) Incremento en la densidad celular después de 7 días	41
9	Efecto del flujo molar de CO ₂ sobre A) el incremento y productividad de masa celular (DCW). B) la relación masa por célula de cultivos de <i>N. oleoabundans</i>	43
10	Efecto del flujo molar de CO ₂ sobre A) la producción y productividad de lípidos. B) el contenido celular de lípidos en cultivos de <i>N. oleoabundans</i>	45
11	Efecto del flujo molar de CO ₂ en la composición bioquímica final	46
12	Efecto del flujo molar de CO ₂ en A) la producción y productividad de carbohidratos. B) el contenido celular de carbohidratos	49
13	Efecto del flujo molar de CO ₂ sobre A) la producción y productividad de proteínas. B) el contenido celular de proteínas	50
14	Efecto del flujo molar de CO ₂ sobre la cantidad de pigmentos. A) Clorofila total. B) Carotenoides	52
15	Diagrama de curvas de nivel en 3 dimensiones del peso seco por célula como respuesta a diferentes porcentajes de CO ₂ y flujos de gas	54
16	Diagrama de curvas de nivel en 3 dimensiones del contenido de lípidos por célula como respuesta a diferentes porcentajes de CO ₂ y flujos de gas	55
17	Efecto del porcentaje de CO ₂ sobre la densidad celular	57

18	Evaluación del incremento en el número de células como función del flujo molar de CO ₂ en un FBR de 11L	58
19	Evaluación de la densidad celular en un FBR de 10.5 L operado como columna de burbujeo	61
20	Evaluación de la composición bioquímica en cultivos de <i>N. oleoabundans</i> en un FBR de 10.5 L operado como columna de burbujeo	62
21	pH y concentración de CO ₂ y O ₂ en el medio de cultivo en el FBR de 10.5 L	63
22	Curvas de O ₂ disuelto (en porcentaje con respecto a la saturación) de los cultivos evaluados en el diseño experimental	76
23	Curvas de CO ₂ disuelto de los cultivos evaluados en el diseño experimental	76
24	Cinéticas de crecimiento de <i>N. oleoabundans</i> a 25 y 29 °C. 0.5 vvm con 2.51% de CO ₂ , pH 7, antibiótico.	79

RESUMEN

En la actualidad, se requiere de fuentes alternas de energía que sean renovables, sustentables y amigables con el ambiente, así como estrategias para mitigar los niveles de CO₂ en el ambiente. Una de estas estrategias es el uso de microalgas para la producción de biodiesel.

Una microalga cuyo potencial para la producción del biocombustible ha sido reconocida es *Neochloris oleoabundans*; la cual, en condiciones fototróficas y mediante limitación de nutrientes (*i.e.* nitrógeno), puede llegar a contener entre un 35 y 54% (en peso seco) de lípidos, con el perfil de ácidos grasos adecuado para la producción de biodiesel. En este proyecto se evaluó el efecto del flujo molar de CO₂ (variando el porcentaje y flujo total de gas) sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *N. oleoabundans* mediante un diseño experimental hexagonal y un análisis de varianza en un fotobiorreactor (FBR) de tanque agitado de 1 L. Adicionalmente, se utilizó un FBR de columna de burbujeo de 10.5 L con el objetivo de determinar si era posible realizar el escalamiento del cultivo empleando como criterio el flujo molar de CO₂, manteniendo constante la relación área de incidencia de la luz con respecto al volumen de cultivo y el flujo molar de gas. Por último, se evaluó el contenido relativo de lípidos, mediante citometría de flujo, empleando un FBR de tanque agitado de 11 L.

En el FBR de tanque agitado de 1 L, se encontró que el porcentaje de CO₂ y el flujo total de gas, en el intervalo probado (0.0040 – 0.3993 mmol CO₂/L/min), no tienen un efecto significativo sobre el crecimiento celular (evaluado como el incremento en la densidad celular y la producción de peso seco), lípidos, carbohidratos y proteínas, pero a flujos mayores de 1.1161 mmol CO₂/L/min, el CO₂ resulta tóxico para la microalga.

En la columna de burbujeo se encontró el mayor contenido de lípidos del estudio, siendo 68% mayor en comparación con el FBR de 1 L suministrado con el mismo flujo molar de CO₂. Así, los resultados obtenidos con el FBR de columna de burbujeo permitieron determinar que es posible escalar el cultivo manteniendo el flujo molar de CO₂ constante.

En el FBR de tanque agitado de 11 L, los datos obtenidos por citometría de flujo sugieren un mayor contenido de lípidos al suministrar el cultivo con aire enriquecido con CO₂, en comparación con uno alimentado sólo con aire.

En general, los resultados indican que el crecimiento y la composición macromolecular de la microalga, con un alto contenido de lípidos (por encima de 30%), no varían significativamente al variar el flujo molar de CO₂ en el intervalo de 0.0040 a 0.5603 mmol CO₂/L/min, lo cual ofrece la ventaja de generar buenas productividades de biomasa y lípidos para su aplicación en la manufactura de biodiesel al utilizar solamente el CO₂ presente en el aire, sin requerir un acoplamiento a una fuente rica en CO₂.

ABSTRACT

Nowadays, renewable, sustainable and environmentally friendly energy sources are needed, as well as strategies to help mitigating the CO₂ levels in the environment. One of these strategies is the use of microalgae for biodiesel production.

A microalga whose potential has been acknowledged for the production of this biofuel is *Neochloris oleoabundans*, which, in phototrophic conditions with nutrient limitation (*i.e.* nitrogen), can contain between 35 and 54% (dry cell weight) of lipids, with an adequate fatty acids' profile for biodiesel production. In this project, the effect of the CO₂ molar flow rate (by varying the percentage of CO₂ and the total gas flow rate) on growth and biochemical composition of *N. oleoabundans*, by the use of an hexagonal experimental design and an analysis of variance in a 1-L stirred tank photobioreactor (PBR) was evaluated. Additionally, a 10.5-L bubble column PBR was used to determine the use of the CO₂ molar flow rate as a scale-up criterion, in such experiments, the ratio of the area of light incidence to the culture volume and the CO₂ molar flow rate was kept constant. Finally, the relative content of lipids was evaluated in an 11-L stirred tank PBR by means of flow cytometry.

In the 1-L stirred tank photobioreactor, it was found that the percentage of CO₂ and the total gas flow rate, in the range tested (0.0040 – 0.3993 mmol CO₂/L/min), do not have a significant effect on cell growth (evaluated as the increase in cell density and dry cell weight production), lipids, carbohydrates and proteins content. However, at flow rates higher than 1.1161 mmol CO₂/L/min, CO₂ becomes toxic for the microalga.

In the bubble column, the highest lipid content of this study was found; this value was 68% higher than the one from the 1-L FBR supplied with the same molar flow rate of CO₂. The results obtained with the bubble column PBR allow determining that it is possible to scale-up the culture by keeping the CO₂ molar flow rate constant.

In the 11-L stirred tank PBR, the data obtained by flow cytometry suggest a higher content of lipids when the culture is supplied with air enriched with CO₂, compared to the one fed only with air.

In general, the results indicate that growth and macromolecular composition of the microalga, with a high lipid content (above 30%), do not change significantly when the CO₂ molar flow rate is varied within the range from 0.0040 to 0.5603 mmol CO₂/L/min, which offers the great advantage of obtaining good biomass and lipid productivities for biodiesel production using only the CO₂ contained in the air, *i.e.* without a special source of CO₂.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales desafíos a los que se enfrenta la humanidad en este siglo es el agotamiento de los combustibles fósiles. A su vez, su combustión es una de las responsables de la contaminación local del aire y del calentamiento global, debido a las altas emisiones de CO₂ producidas. Es por esto que se requieren fuentes alternas de energía que sean sustentables, renovables y amigables con el ambiente. Una alternativa energética que ha tomado importancia en los últimos años es el biodiesel. Este biocombustible está constituido por monoalquil-ésteres de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes de cadena corta, obtenidos a partir de biomasa renovable¹.

En la actualidad, se reconoce al biodiesel como un biocombustible capaz de sustituir al diesel de petróleo¹. Es producido a partir de aceites provenientes de plantas oleaginosas (colza, soya, girasol y palma, entre otras); no obstante, se ha propuesto el uso de microalgas oleaginosas debido a que, en comparación con las plantas, su contenido de aceite es mayor, son una fuente de biomasa versátil gracias a su alta eficiencia fotosintética (3 – 8% de la energía solar puede ser convertida en biomasa, mientras que en las plantas terrestres es de sólo 0.5%) y presentan productividades y velocidades de crecimiento superiores. Potencialmente se pueden cultivar en una amplia variedad de climas, en superficies no aptas para cultivos, evitando así la competencia con cultivos alimenticios, y se ha probado a nivel laboratorio que su productividad es al menos 10 veces mayor que el aceite de palma, uno de los cultivos con mayor contenido lipídico, lo cual permitiría desplazar completamente al diesel derivado del petróleo²⁻⁵.

Asimismo, el cultivo de microalgas para la producción de compuestos de valor comercial y biodiesel, ayuda a mitigar la contaminación, disminuyendo los niveles de CO₂ en el ambiente y ayudando al tratamiento de aguas residuales, al aprovechar los componentes para su crecimiento⁶⁻⁸.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos procariotas o eucariotas capaces de crecer tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos³. Muchas microalgas poseen una cantidad de lípidos considerable; sin embargo, no todas presentan el perfil lipídico adecuado para la producción de biodiesel. Una microalga que ha sido reconocida como

prometedora para la producción de dicho biocombustible es *Neochloris oleoabundans*, la cual es una eucariota edáfica que puede llegar a contener entre un 35 y un 54% de lípidos en peso seco, de los cuales aproximadamente el 80% son triacilglicéridos, con ácidos grasos saturados principalmente, característica necesaria para que el biodiesel sea resistente a la oxidación^{2, 9, 10}. El cultivo de las microalgas se puede realizar en sistemas cerrados (fotobiorreactores) o abiertos (estanques)^{11, 12}.

Diversos estudios han revelado que el suplemento de carbono al sistema de cultivo es una de las principales dificultades y limitantes que se debe resolver: el CO₂ no debe alcanzar una concentración que produzca inhibición en el cultivo, pero tampoco debe caer por debajo de un valor que limite el crecimiento¹³.

De acuerdo al contexto descrito, y dada la relevancia del CO₂ como fuente de carbono de las microalgas oleaginosas, en el presente trabajo se decidió evaluar el efecto que tiene la concentración de CO₂ y el flujo total de gas, es decir, el flujo molar de CO₂, sobre la densidad celular, el peso seco, el contenido de lípidos, el perfil de ácidos grasos, los carbohidratos y las proteínas de la microalga *N. oleoabundans* en fotobiorreactores, principalmente de tanque agitado de 1 L.

2. ANTECEDENTES

2.1 Biodiesel

El biodiesel está constituido por monoalquil-ésteres de ácidos grasos de cadena larga con alcoholes de cadena corta, obtenidos a partir de biomasa renovable. En la actualidad, el biodiesel ha sido reconocido como un combustible capaz de sustituir al diesel de petróleo^{1, 14}, con propiedades comparables al petro-diesel, y que puede ser utilizado directamente en los motores de compresión-ignición (diesel) comunes¹⁵.

En comparación con el combustible de origen fósil, ofrece las ventajas de ser renovable, poseer mejor eficiencia de combustión, sin contenido de sulfuro y compuestos aromáticos, mayor índice de cetano y es biodegradable. Además, el biodiesel ofrece beneficios de seguridad al poseer un mayor punto de inflamación que el diesel de petróleo (150 °C comparado con 77 °C). Sin embargo, este biocombustible también posee algunas desventajas, tales como menor contenido energético, mayor punto de niebla y, actualmente, mayor costo de producción¹⁵.

Asimismo, cabe mencionar que los combustibles oxigenados, como los ésteres de ácidos grasos (biodiesel), presentan una mejor y más completa combustión. Además, la producción de monóxido de carbono y partículas de hollín disminuye notablemente¹⁴.

2.1.1 Métodos de producción de biodiesel

El uso directo de triacilglicéridos (TAG) como combustibles trae consigo un gran número de problemas debidos principalmente a sus altas viscosidades, baja volatilidad y carácter poliinsaturado. Para contrarrestar los problemas del uso directo de aceites en motores diesel convencionales, se utilizan métodos que permiten la producción de biodiesel¹⁵.

El método más utilizado y prometedor para la producción de biodiesel es la transesterificación o alcoholísis; en éste, los TAG reaccionan con alcoholes de cadena corta para producir los ésteres de ácidos grasos correspondientes (biodiesel) y glicerol (**Figura 1**). La transesterificación requiere 3 moles de alcohol por cada mol de TAG para producir un mol de glicerol y tres moles de alquilésteres^{15, 16}.

La reacción utiliza alcoholes alifáticos primarios o secundarios, siendo el etanol y el metanol los más utilizados¹⁵. La transesterificación puede ser catalizada por ácidos, álcalis o enzimas, siendo la catálisis alcalina la más utilizada a nivel comercial^{15, 16}.

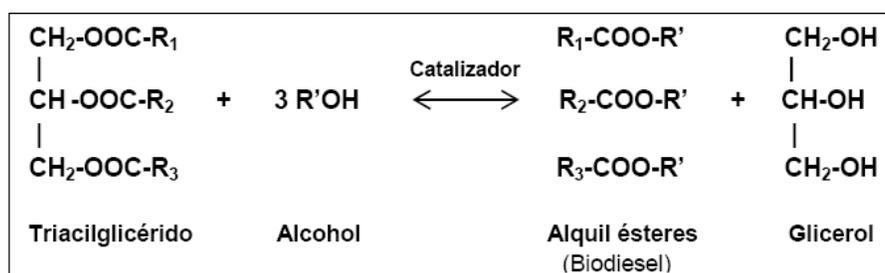


Figura 1. Transesterificación de aceite a biodiesel. R₁₋₃ son grupos hidrocarbonados.

2.1.2 Propiedades del biodiesel como biocombustible

Conforme el biodiesel ha ganado importancia, se ha creado la necesidad de tener estándares que aseguren las propiedades y calidad del combustible de manera que su comercialización sea exitosa. Los estándares de biodiesel se han desarrollado en varios países y regiones alrededor del mundo, incluyendo los EUA (ASTM D 6751, **Tabla 1**), Europa (EN 14214, **Tabla 1**), Brasil, Sudáfrica y Australia, entre otras¹⁷.

Debido a la naturaleza de la materia prima, el proceso de producción y el manejo subsecuente del producto, muchos factores pueden influir en la calidad del biodiesel¹⁷. Asimismo, las características de los componentes del biodiesel están determinadas por la estructura, tanto de la fracción lipídica como de la alcohólica, de cada una de las moléculas esterificadas. Los parámetros estructurales que influyen en las propiedades del biodiesel son la longitud de la cadena, el nivel de insaturación y el grado de ramificación. Las propiedades del biocombustible afectadas por los parámetros citados son el índice de cetano, la emisión de gases, el calor de combustión, las propiedades de flujo, la estabilidad oxidativa, la viscosidad y la lubricidad; propiedades esenciales para el funcionamiento adecuado del combustible¹⁸.

Una propiedad importante es la viscosidad, la cual afecta el transporte a través de las tuberías e influye en la atomización del combustible durante su inyección y, por ende, en la formación de residuos en el motor (problema acentuado por valores altos de

viscosidad), llevando a una combustión limitada en el cilindro. La viscosidad cinemática incrementa con la longitud de la cadena (tanto del ácido graso como de la fracción alcohólica en el éster) y disminuye con el grado de insaturación (tanto por el número de dobles enlaces en los ácidos grasos, como por la naturaleza, favoreciéndolo la configuración *cis* de los dobles enlaces)^{14, 18, 19}.

Tabla 1. Norma ASTM D 6751 (ASTM: American Society for Testing and Materials) y EN 14214 para el biodiesel en EUA y Europa, respectivamente.

Propiedad	ASTM D 6751 ^{17, 22}		EN 14214 ¹⁷	
	Límite	Unidad	Límite	Unidad
Punto de inflamación	130.0 _{mín}	°C	120 _{mín}	°C
Densidad, 15 °C	–	–	860-900	kg/m ³
Contenido de agua	0.050 _{máx}	% volumen	500 _{máx}	mg/kg
Viscosidad cinemática, 40 °C	1.9-6.0	mm ² /s	3.5-5.0	mm ² /s
Ceniza	0.020 _{máx}	% peso	0.02 _{máx} , sulfatada	% (mol/mol)
Azufre	0.0015 _{máx}	ppm	10.0 _{máx}	mg/kg
Número cetano	47 _{mín}	–	51 _{mín}	–
Punto de niebla	ND ^a	°C	–	–
Número ácido	0.50	mg KOH/g	0.50 _{máx}	mg KOH/g
Índice de yodo	–	–	120 _{máx}	g I ₂ /100g
Glicerina libre	0.020 _{máx}	% peso	0.020 _{máx}	% (mol/mol)
Glicerina total	0.240 _{máx}	% peso	0.25 _{máx}	% (mol/mol)
Contenido de fósforo	0.001 _{máx}	% peso	10.0 _{máx}	mg/kg
Sodio + Potasio	5.0 _{máx}	ppm	5.0 _{máx}	mg/kg
Calcio + Magnesio	5.0 _{máx}	ppm	5.0 _{máx}	mg/kg
Temperatura de destilación, 90% recuperado	360 _{máx}	°C	–	–

ND: No DETERMINADO. ^a No hay un límite determinado debido a la variación de las condiciones climáticas en EUA; en relación a éstas se define el punto de niebla para el biocombustible.

El número cetano (NC), es un número adimensional que describe la calidad de encendido del combustible^{17, 18, 20} y está relacionado con el retraso en el encendido que sufre un combustible al ser inyectado en la cámara de combustión. Generalmente, a

mayor NC, menor es el tiempo de retraso y el combustible es más propenso a ser encendido¹⁷. La fracción lipídica de las moléculas esterificadas influye notablemente en el NC del combustible: a mayor longitud de cadena, menor nivel de insaturación y menor grado de ramificación, mejor es la calidad de encendido¹⁸.

El punto de niebla (PN) y el punto de vertido (PV) permiten evaluar el comportamiento del biodiesel a bajas temperaturas^{14, 17}. El PN es la temperatura a la que un material lipídico líquido se torna turbio debido a la formación de cristales y a la solidificación de compuestos saturados¹⁸. El PV es la temperatura mínima a la cual el combustible aún es líquido y puede ser bombeado. En general, el PN y PV disminuyen con un aumento en la longitud de la cadena y ramificación de la fracción alcohólica¹⁴.

El biodiesel puede sufrir degradación oxidativa, hidrolítica y microbiana durante su almacenamiento. En comparación con el diesel de petróleo, el biodiesel es menos tóxico y es biodegradable, porque muchos microorganismos poseen enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces ésteres. Por otro lado, la degradación oxidativa está relacionada con el número de dobles enlaces en los ácidos grasos, el contenido de hidroperóxidos o antioxidantes naturales, temperatura y la presencia de luz ultravioleta y aire¹⁴.

Con base en esto, se entiende la relevancia del perfil lipídico para la producción de biodiesel. Preferentemente, se requieren ácidos grasos de cadena larga con un alto grado de saturación, que permitan disminuir las emisiones tóxicas y mejorar sus propiedades, sin comprometer las características de flujo a bajas temperaturas, la viscosidad y la lubricidad del combustible¹⁸.

2.2 Aceites vegetales como materia prima

El biodiesel es obtenido principalmente a partir de aceites vegetales provenientes de cultivos alimenticios y semillas oleaginosas³, siendo los aceites vegetales comestibles los más utilizados (aproximadamente el 85% de la producción mundial). En el 2010, la producción de biodiesel alcanzó los 19.83 billones de litros, siendo la Unión Europea y Estados Unidos los principales productores. Argentina se ubica como el principal productor de biodiesel en los países en desarrollo y se espera que genere el 8% de la

producción global para el 2020²¹. Los principales cultivos utilizados como materia prima son canola (59%), soya (25%), aceite de palma (10%) y aceite de girasol (5%)¹⁵.

Sin embargo, el uso de los aceites vegetales para la alimentación humana y el elevado precio del biodiesel (1.0735 dólares americanos por litro en el 2010) han obstaculizado su comercialización masiva²¹. Es por esto que se han explorado alternativas para minimizar los costos de la materia prima. Una de ellas es el uso de aceites de desecho y grasas animales; no obstante, a pesar de disminuir los costos de los insumos, los gastos adicionales necesarios para su refinamiento hacen que no sea una alternativa satisfactoria. Otra opción explorada es el uso de aceites derivados de plantas no comestibles (e.g. *Jatropha curcas*, *Pongamia pinnata*)²³.

Desafortunadamente, el biodiesel derivado de cultivos oleaginosos, aceite de desecho y grasa animal no es capaz de satisfacer ni una pequeña fracción de la demanda existente de combustibles para el transporte (**Tabla 2**). Por ejemplo, utilizando aceite de palma, se requeriría del 24% de la tierra fértil de los EUA para cubrir el 50% de los requerimientos de combustibles utilizados para transporte. De acuerdo a los datos de la **Tabla 2**, en función de disponibilidad de espacio requerido para los cultivos, las microalgas son aparentemente la única fuente de lípidos para la producción de biodiesel capaz de sustituir por completo al diesel de origen fósil¹⁶.

Tabla 2. Comparación entre algunas fuentes de biodiesel para cubrir el 50% del combustible necesario para el transporte en los EUA¹⁶.

Cultivo	Producción de aceite (L/ha)	Área requerida (M ha)
Maíz	172	1540
Soya	446	594
<i>Jatropha</i>	1892	140
Coco	2689	99
Aceite de palma	5950	45
Microalgas ^a	136,900	2
Microalgas ^b	58,700	4.5

^a 70% de aceite (en peso) en la biomasa. ^b 30% de aceite (en peso) en la biomasa.

2.3 Microalgas oleaginosas como materia prima alterna

El mundo requiere una fuente de energía sustentable y amigable con el ambiente para el futuro. Es por esto que el uso de microorganismos autotróficos ha sido propuesto para reducir la dependencia energética en los combustibles de origen fósil.

Una de estas alternativas energéticas es el biodiesel a partir de microalgas oleaginosas. Algunas ventajas que se han encontrado para la producción de biocombustibles a gran escala son el rendimiento potencial por hectárea, los requerimientos de superficie, la producción amigable con el ambiente y las tecnologías científicas disponibles²⁴. Asimismo, el cultivo de microalgas para la producción de compuestos de valor comercial y biodiesel, ayuda a no incrementar las emisiones de CO₂ al ambiente^{6, 7}.

En general, las microalgas oleaginosas contienen entre 20 y 50% de lípidos, con una composición variable entre las diferentes especies (**Tabla 3**), formados principalmente por ácidos grasos saturados e insaturados con 12 – 22 átomos de carbono³.

Aunado a lo mencionado anteriormente, las microalgas ofrecen las siguientes ventajas:

1. Requieren solamente de materiales simples para su crecimiento (sales minerales, CO₂, agua y luz solar).
2. Pueden cultivarse todo el año.
3. Utilizan menos agua que las plantas y ésta puede ser dulce, salobre o residual (permitiendo el tratamiento de efluentes agroindustriales, al mismo tiempo que utilizan NH₄⁺, NO₃⁻ y PO₄³⁻ como nutrientes).
4. Poseen una mayor velocidad de crecimiento, en comparación con las plantas.
5. Permiten la fijación de CO₂.
6. Se puede modificar la cantidad de lípidos, carbohidratos y proteínas presentes mediante variaciones en las condiciones de cultivo y con nuevos desarrollos biotecnológicos mediante ingeniería de vías metabólicas.
7. Trae consigo la obtención de co-productos de valor (e.g. de la biomasa residual se puede obtener metano, alimento para ganado, fertilizantes orgánicos, pigmentos, etc.)^{2, 3, 16, 25, 26}.

Tabla 3. Contenido lipídico y productividades de diferentes especies de microalgas³.

Especie de microalga	Contenido lipídico (% en peso)	Productividad lipídica (mg/L/día)	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	24.0 – 31.0	–	–
<i>Botryococcus braunii</i>	25.0 – 75.0	–	0.02
<i>Chaetoceros muelleri</i>	33.6	21.8	0.07
<i>Chaeroceros calcitrans</i>	14.6 – 16.4/39.8	17.6	0.04
<i>Chlorella emersonii</i>	25.0 – 63.0	10.3 – 50.0	0.036 – 0.041
<i>Chlorella photothecoides</i>	14.6 – 57.8	1214	2.00 – 7.70
<i>Chlorella sorokiniana</i>	19.0 – 22.0	44.7	0.23 – 1.47
<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0 – 58.0	11.2 – 40.0	0.02 – 0.20
<i>Chlorella</i> sp.	10.0 – 48.0	42.1	0.02 – 2.5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	2.0	–	2.90 – 3.64
<i>Chlorella</i>	18.0 – 57.0	18.7	–
<i>Chlorococcum</i> sp.	19.3	53.7	0.28
<i>Cryptothecodinium cohnii</i>	20.0 – 51.1	–	10
<i>Dunaliella salina</i>	6.0 – 25.0	116.0	0.22 – 0.34
<i>Dunaliella primolecta</i>	23.1	–	0.09
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16.7 – 71.0	–	0.12
<i>Dunaliella</i> sp.	17.5 – 67.0	33.5	–
<i>Ellipsoidion</i> sp.	27.4	47.3	0.17
<i>Euglena gracilis</i>	14.0 – 20.0	–	7.70
<i>Haematococcus pluvialis</i>	25.0	–	0.05 – 0.06
<i>Isochrysis galbana</i>	7.0 – 40.0	–	0.32 – 1.60
<i>Isochrysis</i> sp.	7.1 - 33	37.8	0.08 – 0.17
<i>Monodus subterraneus</i>	16.0	30.4	0.19
<i>Monallanthus salina</i>	20.0 – 22.0	–	0.08
<i>Nannochloris</i> sp.	20.0 – 56.0	60.9 – 76.5	0.17 – 0.51
<i>Nannochloropsis oculata</i>	22.7 – 29.7	84.0 – 142.0	0.37 – 0.48
<i>Nannochloropsis</i> sp.	12.0 – 53.0	37.6 – 90.0	0.17 – 1.43
<i>Neochloris oleoabundans</i>	29.0 – 65.0	90.0 – 134.0	–
<i>Nitzschia</i> sp.	16.0 – 47.0	–	–
<i>Oocystis pusilla</i>	10.5	–	–
<i>Pavlova salina</i>	30.9	49.4	0.16
<i>Pavlova lutheri</i>	35.5	40.2	0.14

Tabla 3. Contenido lipídico y productividades de diferentes especies de microalgas (continuación)³.

Especie de microalga	Contenido lipídico (% en peso)	Productividad lipídica (mg/L/día)	Productividad volumétrica de biomasa (g/L/día)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18.0 – 57.0	44.8	0.003 – 1.9
<i>Porphyridium cruentum</i>	9.0 – 18.8/60.7	34.8	0.36 – 1.50
<i>Scenedesmus obliquus</i>	11.0 – 55.0	–	0.004 – 0.74
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	1.9 – 18.4	35.1	0.19
<i>Scenedesmus</i> sp.	19.6 – 21.1	40.8 – 53.9	0.03 – 0.26
<i>Skeletonema</i> sp.	13.3 – 31.8	27.3	0.09
<i>Skeletonema costatum</i>	13.5 – 51.3	17.4	0.08
<i>Spirulina platensis</i>	4.0 – 16.6	–	0.06 – 4.3
<i>Spirulina máxima</i>	4.0 – 9.0	–	0.21 – 0.25
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	20.6	17.4	0.08
<i>Tetraselmis suecica</i>	8.5 – 23.0	27.0 – 36.4	0.12 – 0.32
<i>Tetraselmis</i> sp.	12.6 – 14.7	43.4	0.30

Sin embargo, no todas las microalgas presentan el perfil lipídico adecuado para la producción de biodiesel. Una microalga identificada con potencial para la producción de dicho biocombustible es *Neochloris oleoabundans*¹⁰.

2.4 *Neochloris oleoabundans*

N. oleoabundans es una microalga eucariota edáfica aislada de la cima de suelos áridos de las dunas de arena en Arabia Saudita por Chantanachat y Bold en 1962²⁷. Es de agua dulce y pertenece a la clase *Chlorophyceae* y a la familia *Chlorococcaceae*⁹.

El potencial de *N. oleoabundans* para la producción de lípidos ha sido reconocido desde hace casi 40 años. En 1970, se identificó que células adultas de microalgas del género *Neochloris* pueden acumular gotas lipídicas tanto intracelular como extracelularmente, dependiendo de la especie. Pero no fue hasta 1980, que se reconoció el potencial de *Neochloris* para acumular lípidos gracias a procedimientos de tinción específicos para lípidos neutros y aceites de células microalgales¹⁰.

Se ha reportado que *N. oleoabundans* puede llegar a contener entre un 35 y un 54% en peso seco de lípidos, de los cuales aproximadamente el 80% son triacilglicéridos,

con una gran proporción de ácidos grasos saturados, característica necesaria para que el biodiesel sea resistente ante la oxidación y el deterioro^{2, 9, 10}. La composición de los ácidos grasos en *N. oleoabundans* consiste en cadenas en un rango de C₁₄ a C₂₀, con números pares predominantemente existentes en su forma saturada, mono- o di-insaturada. Los ácidos grasos presentes en mayor proporción son: oleico (18:1 ω₉, 36%), palmítico (16:0, 15%), esteárico (18:0, 11%), y linoleico (18:2, 7.4%). El ácido linolénico (18:3 ω₃) se encuentra en una proporción menor al 12%, lo cual está conforme a los Estándares Europeos EN 14214 (**Tabla 1**) para la producción de biodiesel^{9, 10}. El índice de yodo (indicador del número de insaturaciones) de los aceites en esta microalga cumple con los estándares de calidad requeridos para el biodiesel, lo que significa que pueden competir con los aceites obtenidos a partir de plantas oleaginosas^{2, 9}.

En estudios previos, se ha demostrado que la composición de los lípidos se puede modificar al alterar las condiciones de cultivo. Se encontró que la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo permite modificar el contenido de lípidos en las microalgas (un medio limitado en nitrógeno permite aumentar hasta en un 50% la cantidad de lípidos), así como influir en la insaturación de los ácidos grasos presentes (una baja concentración de nitrógeno favorece la biosíntesis de ácidos grasos saturados que le confiere resistencia ante la oxidación y el deterioro)^{9, 10}. Otro factor que impacta en el perfil de ácidos grasos es la temperatura: a menor temperatura, incrementa el número de insaturaciones⁹.

En un trabajo previamente realizado en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, se encontró que utilizando aire (2 vvm (litros de gas/litro de medio/min), 0.035% v/v de CO₂), las condiciones que favorecieron la producción y productividad de lípidos con *N. oleoabundans* fueron: limitación de nitrógeno con una concentración de 0.6 mM, mantenidos durante un periodo de 9 días, a 25 °C. Esto generó una producción de 0.39 g_{Lípidos}/L y una productividad global de 35.03 mg_{Lípidos}/L/día, dando como resultado un contenido de 43.9% (g_{Lípidos}/g_{DCW}). Con base a estos resultados, se estima que para satisfacer el 100% de la demanda de diesel en México (23,630 millones de litros en el 2008) a partir de aceites proveniente de *N. oleoabundans* se requeriría de 2.3 Mha, magnitud que corresponde al 1.2% de la superficie total de México²⁸. Con esto se

justifica el potencial de *N. oleoabundans* para la producción de biodiesel a escala comercial.

2.5 Sistemas de producción de microalgas

Como un producto de valor comercial relativamente bajo que se desea producir a gran escala, el reto principal es asegurarse que la producción de biodiesel no cueste más energéticamente que el propio biocombustible. Para la producción de biocombustibles a partir de microalgas, los factores que se deben tomar en cuenta son:

- Viabilidad del uso de sistemas abiertos o cerrados.
- Estrategias a tomar para evitar la contaminación por microorganismos adventicios.
- Productividad volumétrica de masa celular y lípidos.
- Concentración de lípidos en las células.
- Estrategias de cosecha celular, así como de recuperación y purificación de lípidos.
- Condiciones ambientales para el cultivo de las microalgas, tales como pH, temperatura, agitación y sistemas de abastecimiento de CO₂, entre otros.
- Suplemento de nutrientes y CO₂ al cultivo²⁹.

En la **Tabla 4**, se muestra una comparación general de los sistemas abiertos y cerrados para las microalgas.

2.5.1 Sistemas cerrados: Fotobiorreactores

En los sistemas cerrados de fotobiorreactores (FBR), el cultivo de los microorganismos puede ser aislado del medio ambiente, lo cual permite un mayor control y regulación de los parámetros biotecnológicos más importantes (temperatura, aireación, mezclado y transferencia de masa). Pueden diseñarse con diversas configuraciones (laminares, de paneles planos, burbujeo, columna vertical y tanques agitados) y se fabrican con materiales transparentes, lo cual permite una mejor penetración de luz^{12, 30}. En contraste con los sistemas abiertos, en los cerrados se reduce el riesgo de contaminación y la pérdida de CO₂, las condiciones de cultivo son reproducibles, se requiere un menor espacio y los periodos de producción son más

cortos (2 – 4 semanas comparado con 6 – 8 semanas en sistemas abiertos). Sin embargo, sus altos costos, debido principalmente a la energía invertida en la agitación mecánica aplicada para el mezclado y la distribución del CO₂, hacen que esta tecnología sólo sea conveniente para estudios a nivel laboratorio, para el cultivo de especies cuyo producto sea de alto valor (productos farmacéuticos, alimenticios y cosméticos)^{11, 12} o para escalas relativamente pequeñas.

Tabla 4. Comparación de los sistemas abiertos y cerrados para la producción de microalgas⁶.

	Sistemas abiertos	Sistemas cerrados
Riesgo de contaminación	Alto	Bajo
Pérdida de CO ₂	Alta	Baja
Pérdidas por evaporación	Altas	Bajas
Eficiencia en el uso de la luz	Pobre	Excelente
Relación área/volumen	Baja	Alta
Control del proceso	Difícil	Fácil
Productividad de biomasa	Baja	Alta
Costos de inversión	Bajos	Altos
Costos de operación	Bajos	Altos
Costos de cosecha	Altos	Relativamente bajos
Escalamiento ascendente	Fácil	Difícil

2.5.2 Sistemas abiertos: estanques tipo circuito

Para productos de bajo costo, y que se requieren en gran cantidad, como es el caso de los biocombustibles, se prefiere el cultivo de las microalgas en sistemas abiertos, los cuales presentan bajos costos de construcción y operación. Es por esto que en la actualidad aproximadamente el 90% de la biomasa microalgal es obtenida en sistemas abiertos y sólo el 10% restante es cultivado en fotobiorreactores cerrados^{6, 31}. Los sistemas abiertos pueden ser naturales (lagos, lagunas, estanques) o artificiales (tanques y estanques tipo circuito ('raceway ponds')).

A nivel comercial, los sistemas estanques tipo circuito son los preferidos. Éstos consisten en un canal de recirculación de una vuelta cerrada, con una profundidad de 15 a 30 cm y cuyo flujo y mezclado son conseguidos con una o más ruedas de paletas^{6, 11, 16}. Estos estanques presentan una relación superficie/volumen grande (conveniente para la penetración de la luz), su construcción es económica y son fáciles de operar, pero tienen las desventajas de que no se puede controlar la contaminación, dificultad de mantener las condiciones ambientales constantes para el cultivo (particularmente la temperatura) y la baja densidad celular que se alcanza, producida por efectos de autosombreado²⁹. Es por esto que los sistemas abiertos son apropiados para especies que puedan crecer en condiciones extremas (T, pH, estrés osmótico, etc.) que les permita competir con otros microorganismos²⁵.

2.6 Suplemento de CO₂

Los gases introducidos a los biorreactores tienen varias funciones en el cultivo de microalgas:

1. Suplemento de CO₂ como fuente de carbono para el metabolismo.
2. Provisión de mezclado interno, ayudando a la homogenización de los nutrientes.
3. Promoción de la exposición de todas las células a la luz, evitando a la par el auto sombreado.
4. Control del pH.
5. Eliminación del oxígeno disuelto acumulado, reduciendo así su toxicidad.

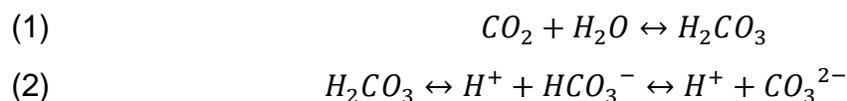
Las fuentes más comunes de CO₂ para las microalgas incluyen: CO₂ atmosférico, CO₂ proveniente de gases de desecho de las plantas industriales y CO₂ fijado químicamente en forma de carbonatos solubles (e.g. NaHCO₃ y Na₂CO₃). No obstante, cabe mencionar que la concentración de CO₂ en la fase gaseosa no necesariamente refleja la concentración a la que está expuesta la célula en la suspensión líquida, la cual depende del pH y el gradiente de CO₂ creado por la resistencia a la transferencia de masa⁷.

Estudios previos han demostrado que una de las principales dificultades y limitantes que debe ser solucionada en los sistemas de cultivo de microalga es el abastecimiento de carbono¹³.

El dióxido de carbono (CO_2) es la fuente de carbono más común para las microalgas fotosintéticas³². Análisis químicos han demostrado que la masa algal consiste de 40-50% de carbono, lo que sugiere que se requiere entre 1.5 y 2.0 kg de CO_2 para producir 1.0 kg de biomasa. El principal punto a considerar en lo referente al CO_2 es que su concentración no debe alcanzar una concentración tan alta que produzca inhibición y, por el otro lado, nunca debe caer por debajo de una concentración mínima que limite el crecimiento. Estas concentraciones máximas y mínimas varían de una especie a otra y pueden alcanzar valores entre $2.3 \times 10^{-2} \text{ M}$ a $2.3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ¹³.

2.6.1 Efecto del CO_2 en el pH

La concentración total de carbono inorgánico y el CO_2 disuelto están interrelacionados. Como se aprecia en el **Figura 2**, el carbono inorgánico disuelto (CID) está en equilibrio con el carbonato (CO_3^{2-}) y el bicarbonato (HCO_3^-), lo cual depende directamente del pH³².



La hidratación y deshidratación del CO_2 , como se muestra en la ecuación (1), son pasos muy lentos; mientras que las reacciones mostradas en la ecuación (2) son instantáneas. Debido a la lentitud de la primera reacción, se piensa que muchos microorganismos prefieren el uso directo de bicarbonato. Por su parte, la deshidratación del CO_2 puede ocurrir de dos formas, dependiendo del pH³³. A pHs bajos (4 – 6), se presenta la primera reacción y la mayor parte del CID se presenta en forma de CO_2 y una pequeña parte en forma de ácido carbónico (H_2CO_3), como lo indica su constante de equilibrio:

$$K = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2][\text{H}_2\text{O}]} = 2.56 \times 10^{-3}$$

A pHs por debajo de 8, la disociación de bicarbonato (HCO_3^-) en H^+ y CO_3^{2-} es mínima^{34, 35}. A pH por encima de 10, la deshidratación del CO_2 ocurre por la siguiente reacción³³:



A pHs intermedios (8-10), ambos métodos de deshidratación son importantes. Además, en este rango de pHs, la deshidratación normal de H_2CO_3 a CO_2 es favorecida por la presencia de iones OH^- ³³.

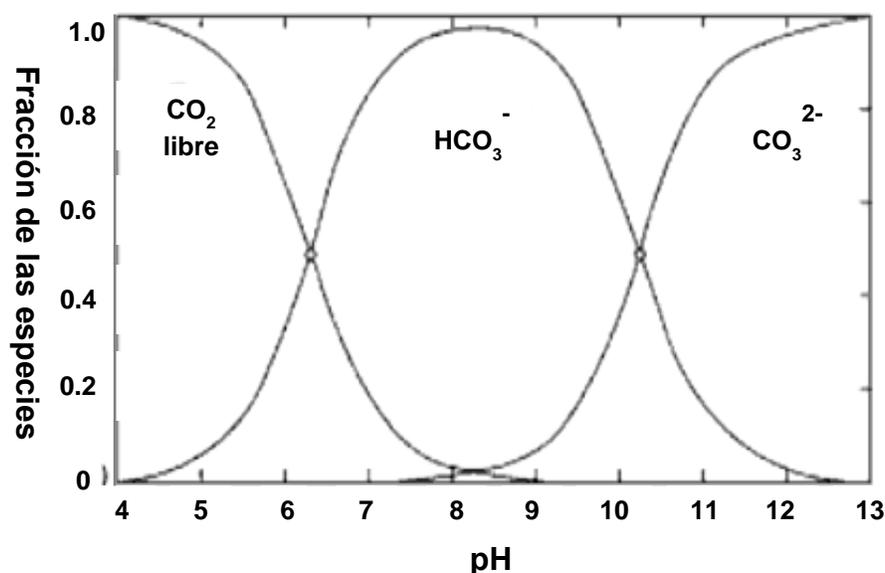


Figura 2. Efecto del pH en la distribución de las especies de carbono inorgánico³⁵.

Las variaciones en el pH del cultivo se deben principalmente al consumo de dióxido de carbono y de otros nutrientes (**Tabla 5**). La pérdida de CO_2 disuelto debido al consumo por las microalgas, es parcialmente compensado por su regeneración a partir de carbonato y bicarbonato. Así, el consumo de CO_2 está involucrado en cambios en el pH³⁶. La alcalinidad del bicarbonato en el medio, a pesar de ser una buena fuente de carbono inorgánico para el crecimiento de los microorganismos, no podría ser suplementado en las cantidades necesarias para optimizar los rendimientos de biomasa debido a problemas asociados con la formación de precipitados³⁷.

El burbujeo continuo de aire enriquecido con CO_2 se utiliza para control de pH y para asegurarse que el carbono inorgánico no es limitante en la producción. Sin embargo, sólo cuando la luz y otros nutrientes no están limitados en el cultivo, el rendimiento de

biomasa es directamente proporcional al flujo de carbono inorgánico (producto del flujo de gas y el porcentaje de enriquecimiento de CO₂ en el gas). Además, sin un sistema amortiguador adecuado, se pueden generar condiciones de pH ácidas y potencialmente tóxicas cuando se burbujea un exceso de CO₂ al medio de cultivo³⁷.

Tabla 5. Reacciones biológicas que afectan el pH³³.

Proceso	Reacción	Efecto en el pH
Fotosíntesis	$6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$	↑
Respiración	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	↓
Desnitrificación	$5\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 24\text{NO}_3^- + 24\text{H}^+ \rightarrow 30\text{CO}_2 + 12\text{N}_2 + 42\text{H}_2\text{O}$	↑

Cabe mencionar que el consumo de nitrato (NO₃⁻) conlleva a un aumento en el pH, dado por la reacción³⁷:



2.6.2 Mecanismo de concentración de CO₂ y anhidrasa carbónica

Las microalgas son capaces de cambiar sus características fotosintéticas en respuesta a las concentraciones de CO₂ en el ambiente. La Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) tiene una afinidad muy baja por el CO₂, debido probablemente a que evolucionó en ambientes ricos en CO₂. Además, los microorganismos fotosintéticos enfrentan un problema para concentrar el CO₂: su fácil difusión a través de las membranas. Las microalgas superan este problema acumulando bicarbonato. Estudios realizados para elucidar el mecanismo por el cual esto ocurre han encontrado que para el uso eficiente del carbono inorgánico disuelto en condiciones de limitación de CO₂ se requieren dos factores: la enzima anhidrasa carbónica (AC) y el mecanismo de concentración de carbono inorgánico (MCC)³⁸.

El MCC puede operar de tres formas: 1) transporte activo de HCO_3^- y/o CO_2 a través de las membranas, 2) bombeo de CO_2 por un mecanismo bioquímico análogo al C_4 y CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) de las plantas superiores terrestres o 3) transporte activo de H^+ produciendo un compartimento ácido alimentado con HCO_3^- , el cual genera una alta concentración de CO_2 (equilibrio) que proporciona CO_2 a la Rubisco en un compartimento cercano más alcalino. Evidencia encontrada sugiere que el primer mecanismo es el responsable de la actividad MCC en algas³⁹.

El MCC se induce cuando los niveles de CO_2 y carbono inorgánico (C_i) son limitados; esto permite un incremento en la acumulación de C_i intracelular y la actividad de la AC proporciona concentraciones internas elevadas de CO_2 a través de la deshidratación del bicarbonato acumulado. El MCC de las microalgas y cianobacterias utiliza transportadores activos que incrementan la concentración intracelular de CO_2 cerca de la Rubisco, facilitando altas velocidades de fijación fotosintética de CO_2 ⁴⁰.

La AC es una metaloproteína que cataliza la interconversión de CO_2 y HCO_3^- conforme a la reacción:



Esta enzima ha sido localizada en varias microalgas (e.g. *Dunaliella salina* y *Chlamydomonas reinhardtii*) y su actividad incrementa en presencia de bajas concentraciones de CO_2 . Por ejemplo, en el caso de *Chlamydomonas* se encontró que la concentración de la enzima fue 20 veces mayor al crecerlas en 0.03% de CO_2 en comparación con 1%^{33, 41}.

Las células con habilidad de concentrar CO_2 comparten características que les permiten utilizar el CO_2 de forma eficiente. La primera es su capacidad de acumular bicarbonato, que, como se mencionó anteriormente, puede ser transportado directamente al interior de la célula. La segunda propiedad es que la Rubisco generalmente está empacada en una forma muy específica dentro de la célula fotosintética, en el caso de las microalgas se encuentra en espacios denominados pirenoides. La tercera característica es la presencia de una AC cerca de la Rubisco, la cual le proporciona CO_2 de la poza de HCO_3^- ⁴¹.

2.7 Escalamiento y sus dificultades

El crecimiento de las microalgas puede verse afectado por condiciones de operación del reactor (tiempo de residencia, velocidad de cosecha, transferencia de gas y el equipo de mezclado), las cuales afectan la disponibilidad de CO₂, velocidades de corte y la exposición a la luz⁷.

El problema en el escalamiento ascendente se encuentra en cambios en la relación superficie–volumen, en cambios en el cultivo propio debidos a un incremento en el tiempo de cultivo y en mantener la homogeneidad en sistemas grandes⁴².

En el caso de fotobiorreactores, existen algunos factores que deben ser considerados para el diseño y metodología de escalamiento:

- Se debe proveer luz de manera efectiva y eficiente.
- El suplemento de CO₂ debe ser suficiente y minimizar las pérdidas.
- Se debe remover el oxígeno generado fotosintéticamente, ya que éste puede inhibir el metabolismo o dañar el cultivo si se permite su acumulación³².

En lo que se refiere a la luz, se sabe que la productividad es determinada por la velocidad de crecimiento, la cual es, a su vez, función del perfil luminoso dentro del reactor y del régimen luminoso al cual son expuestas las células. En cultivos microalgales muy densos, la luz no penetra más de algunos centímetros, al ser impedida por auto sombreado y absorción de luz, esto afecta el perfil de radiación dentro del cultivo y, consecuentemente, dentro de un fotobiorreactor existen zonas con diferentes niveles de iluminación. Además de tener un efecto en la disponibilidad de luz, el movimiento del fluido afecta los fenómenos de transporte, es decir, la disponibilidad de dióxido de carbono y otros nutrientes. Vale la pena mencionar que, si bien la disponibilidad de luz determina la velocidad de fotosíntesis y la productividad de biomasa, un valor excesivo de luz puede ser dañino y causar la fotoinhibición^{29, 32}.

La saturación luminosa es la intensidad de luz a la cual la velocidad específica de crecimiento es la mitad del valor máximo ($\mu_{\text{máx}}$). Las constantes de saturación de las microalgas tienden a ser mucho más bajas que el nivel máximo de luz solar que ocurre en el día. Debido a este valor de saturación, la velocidad de crecimiento es más baja de lo que podría ser posible si la constante incrementara sustancialmente. Por otro lado, por encima de un valor determinado, un incremento subsecuente de luminosidad

reduciría la velocidad de crecimiento. Este fenómeno se conoce como fotoinhibición y generalmente resulta en un daño reversible del aparato fotosintético¹⁶.

No existe un método establecido para el escalamiento de estos cultivos. Pero, a menos que el reactor sea escalado mediante un cambio en la longitud (y no en el diámetro), cualquier cambio en las dimensiones involucraría un cambio en los volúmenes relativos de las zonas de luz y oscuridad: bajo condiciones determinadas (de iluminación externa, concentración celular y contenido de pigmento), la profundidad a la cual la intensidad de luz disminuye a un valor limitante del crecimiento no será afectada, pero el diámetro de la zona oscura va a aumentar. El desempeño de un reactor cambiará con el escalamiento: disminuirá, a menos que la frecuencia del intercambio del fluido en las zonas de luz – oscuridad se mantenga constante³².

Otro problema presente en los biorreactores microalgales es la acumulación del oxígeno generado durante la fotosíntesis, especialmente cuando la velocidad de fotosíntesis es alta⁷. Se sabe que concentraciones de oxígeno por encima de los valores de saturación del aire generalmente inhiben la fotosíntesis en las microalgas⁴³. La inhibición por oxígeno ocurre cuando las altas concentraciones de oxígeno inhiben la fotosíntesis al prevenir la regeneración de un aceptor para el CO₂ en el ciclo de reducción del carbono³³. Por ejemplo, en el caso de *Chlorella vulgaris*, la fotosíntesis incrementó en un 14% cuando había muy poco oxígeno disuelto en el medio. Mientras que la saturación del medio con oxígeno puro puede reducir su velocidad de fotosíntesis hasta en el 35%⁴³. Para el caso de *N. oleoabundans*, se encontró una reducción en la velocidad específica de crecimiento (μ) al incrementar la presión parcial de oxígeno (al incrementarla de 0.24 a 0.84, la μ disminuyó de 1.38 a 1.06 día⁻¹), esto debido a una inhibición competitiva de la Rubisco. Sin embargo, este efecto negativo puede ser revertido restaurando la relación O₂/CO₂ al incrementar la presión parcial de CO₂⁴⁴.

Para resolver este problema, se han utilizado instrumentos que permiten desgasificar la solución. Sin embargo, para obtener una buena separación entre las fases gaseosa y líquida, se requiere que el paso a través del desgasificador sea tal que las burbujas más pequeñas tengan tiempo suficiente para separarse del líquido. Desafortunadamente, la remoción del oxígeno con dichos instrumentos es poco satisfactoria. Por ello, se ha

recomendado el uso de varios biorreactores pequeños en lugar de una sola unidad grande⁷.

Otro factor importante en los cultivos microalgales es el suplemento de carbono. Como se mencionó anteriormente, el CO₂ es la fuente más importante de carbono de las microalgas durante el crecimiento fototrófico y, si éste no se suministra de manera apropiada, el crecimiento se verá afectado¹³.

Para una productividad de biomasa de 2 g/L/día, y un contenido de 50% de carbono, la demanda de CO₂ suele ser superior a 0.10 g CO₂/m³/s durante un periodo de 10 horas de luz¹³. Además, el burbujeo de CO₂ al medio de cultivo contribuye a la eliminación del oxígeno producto del metabolismo de las microalgas³². A su vez, la agitación es necesaria para prevenir la sedimentación de las células o su adherencia a la pared del reactor y para promover el intercambio de gases⁴⁵.

En fotobiorreactores tubulares largos, el burbujeo con CO₂ y remoción del O₂ en exceso, producto del metabolismo, es eficiente sólo en el inicio o final del tubo. En las zonas intermedias se generan gradientes decrecientes de concentración de CO₂ y crecientes de concentración de O₂. Esto puede convertirse en un problema debido a que el CO₂ es la fuente principal de carbono y no debe estar limitada y el oxígeno puede acumularse en concentraciones tóxicas para las microalgas⁴⁵.

Adicionalmente, se ha reportado que en especies de microalgas como *Chlorella pyrenoidosa*, altos niveles de CO₂ (30 – 50%) en el gas aspergido favorecen la acumulación de lípidos totales. Sin embargo, las mayores concentraciones de masa celular y velocidades de fijación de CO₂, se alcanzan a concentraciones bajas de CO₂, pero mayores a las del aire (10%). Cabe mencionar que las microalgas reportadas en dicho estudio son capaces de crecer a altas concentraciones de CO₂, porque se ha encontrado que el crecimiento de *Chlorella* sp. y *Nannochloropsis oculata* es inhibido a concentraciones por encima del 5%⁶⁴.

Con base en esto, en este trabajo se decidió evaluar distintos flujos de CO₂ para encontrar un valor que mejore el crecimiento de la microalga oleaginosa *N. oleoabundans* y, a su vez, favorezca la acumulación de metabolitos de reserva de interés.

3. HIPÓTESIS

El flujo molar de dióxido de carbono, dentro del rango de 0.0040 a 0.3993 mmol CO₂/L/min, tendrá un efecto positivo sobre el crecimiento fototrófico de la microalga oleaginosa *Neochloris oleoabundans* y, a su vez, favorecerá una mayor acumulación de metabolitos de reserva: lípidos y/o carbohidratos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del flujo molar de CO₂ sobre el crecimiento y la composición bioquímica de la microalga oleaginosa *Neochloris oleoabundans* en fotobiorreactores de 1 L.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluación de diferentes condiciones de alimentación de CO₂ (flujos de gas y porcentajes de CO₂) sobre el crecimiento y la composición bioquímica (lípidos, carbohidratos, proteínas, clorofilas y carotenoides) de *N. oleoabundans* en un FBR de tanque agitado de 1 L, utilizando un diseño experimental hexagonal de superficie de respuesta (flujos bajos).
- Evaluación del porcentaje de CO₂ a flujos molares mayores (0.5603 y 1.1161 mmol CO₂/L/min) a los evaluados en el diseño experimental hexagonal (0.0040 – 0.3993 mmol CO₂/L/min) sobre el crecimiento de *N. oleoabundans* en FBR de 1 L.
- Determinación del efecto del flujo molar de CO₂, comprendido dentro de los flujos bajos, sobre el contenido relativo de lípidos (citometría de flujo) y el crecimiento de *N. oleoabundans* en un FBR de 11 L.
- Escalamiento del cultivo fototrófico de *N. oleoabundans* a una columna de burbujeo de 10.5 L, manteniendo constante la relación área de incidencia de la luz a volumen de cultivo y la intensidad luminosa, utilizando el flujo molar de CO₂ del punto central del diseño experimental hexagonal (0.1701 mmol CO₂/L/min).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismo

En el presente trabajo se utilizó la cepa de *Neochloris oleoabundans* proveniente de la colección de algas de la Universidad de Texas (UTEX #1185), aislada por Chantanachat y Bold (1962) de suelo árido.

5.2 Medio Basal de Bold (BBM)

El medio utilizado para el cultivo de *Neochloris oleoabundans* es el Medio Basal de Bold o BBM por sus siglas en Inglés (Bold's Basal Medium)^{10, 46}. La preparación de este medio de cultivo requiere de seis soluciones de macronutrientes, numerados del 1-6 y de cuatro soluciones de elementos trazas (7-10). Las concentraciones requeridas para la elaboración de cada una de estas soluciones estándar se indican en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Soluciones estándar para la preparación del medio BBM⁴⁷.

No.	Compuesto	Concentración (g/L)	No.	Compuesto	Concentración (g/L)
1	NaNO ₃	25.00	7	EDTA	50.00
				KOH	31.00
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.50	8	FeSO ₄ ·7H ₂ O ^a	4.98
3	K ₂ HPO ₄	7.50	9	H ₃ BO ₃	11.42
4	KH ₂ PO ₄	17.50	10	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82
5	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.50		MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44
6	NaCl	2.50		MoO ₃	0.71
				CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57
				Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.49

^a Solución acidificada con 1 mL de H₂SO₄.

Para preparar 1 L de medio BBM, se adicionan 10 mL de cada de una de las soluciones de macronutrientes (1-6) y 1 mL de las soluciones de elementos traza (7-10). Posteriormente, el volumen es llevado a 1 L utilizando agua desionizada. Una vez preparado, es esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 lb/in² de presión por 30 min⁴⁷.

5.3 Pre-inóculos e Inóculos

Los pre-inóculos (cultivos de mantenimiento) e inóculos fueron preparados en matraces Erlenmeyer de 250 mL cubiertos con tapones de silicón que facilitaban la difusión de aire estéril. La cepa de *N. oleoabundans* fue mantenida en cultivos líquidos de 100 mL de volumen en BBM, inoculados al 10%, ajustando la densidad celular inicial en 2×10^6 cél/mL. Los cultivos fueron incubados durante 7 días en un cuarto de cultivo, con una temperatura de 25 °C, agitación mecánica de 80 rpm y fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8 h. Para los experimentos de CO₂, los inóculos fueron incubados durante 4 días a una temperatura de 25 °C, agitación mecánica de 300 rpm e iluminación continua con luz blanca a una densidad de flujo de fotones de 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.

5.4 Fotobiorreactores (FBR)

Para la evaluación del efecto del CO₂ sobre la microalga *N. oleoabundans*, se utilizaron 3 fotobiorreactores. La evaluación de diferentes porcentajes de CO₂ y flujos totales de gas se realizó en un FBR de tanque agitado de 1 L de volumen de trabajo. Posteriormente se utilizaron 2 reactores para realizar la evaluación del crecimiento a una escala mayor. El primero, fue un FBR de tanque agitado con un volumen de trabajo de 11 L y el segundo fue una columna de burbujeo con volumen de trabajo de 10.5 L. A continuación se describen los sistemas con mayor detalle.

5.4.1 FBR de tanque agitado

5.4.1.1 FBR 1 L

Se realizó la evaluación del efecto del CO₂ en fotobiorreactores de 1 L instrumentados para controlar la agitación, temperatura, flujo de gas (velocidad de alimentación de diferentes mezclas de CO₂ en aire), pH y para medir la concentración de CO₂ y O₂ disuelto (**Figura 3**). Se realizaron pruebas para determinar las condiciones de alimentación de CO₂ (flujo y % v/v) que favorecieran la productividad de masa celular, lípidos, carbohidratos y proteínas. La geometría del sistema se describe en la **Tabla 7**.

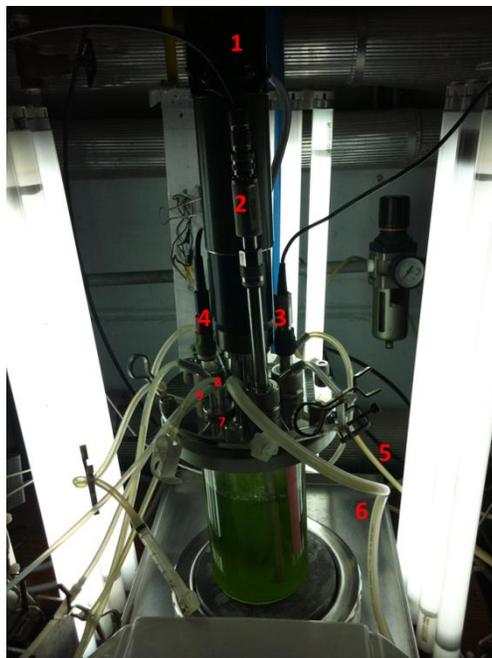


Figura 3. FBR de 1L.

1. Motor
2. Electrodo de O₂
3. Electrodo de CO₂
4. Electrodo de pH
5. Entrada de aire
6. Salida de aire
7. Toma de muestra
8. Alimentación ácido
9. Alimentación base

Tabla 7. Geometría de los fotobiorreactores.

Símbolo	Parámetro	Tanque agitado	Tanque agitado	Columna de burbujeo	Unidades
h	Altura del reactor	0.260	0.405	1.603	m
D	Diámetro interno	0.099	0.210	0.094	m
V_L	Volumen de trabajo	0.0010	0.0110	0.0105	m ³
h_L	Altura del líquido	0.13	0.32	1.50	m
D_i	Diámetro del impulsor	0.032	0.070	–	m
	Número de impulsores	1	2	–	–
D_i/D	Relación diámetro del impulsor/ diámetro del reactor	0.3232	0.3333	–	Adimensional
A_L	Área del volumen de trabajo expuesta directamente a la luz	0.04	0.21	0.42	m ²
A_L/V_L	Relación de la superficie expuesta a la luz respecto al volumen de trabajo	40.43	19.19	42.19	m ² /m ³

Los fotobiorreactores fueron inoculados al 10% (v/v) con células de la microalga que se encontraban en la fase exponencial de crecimiento. Se agregó un volumen de inóculo de *N. oleoabundans* tal que la densidad celular inicial fuera de aproximadamente 1×10^6 células/mL.

Una vez inoculados bajo condiciones asépticas, los cultivos de *N. oleoabundans* en medio BBM, fueron monitoreados diariamente durante 7 días bajo las condiciones siguientes: temperatura de 25 °C, iluminación continua con luz blanca a una intensidad luminosa de $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y agitación de 600 rpm con un impulsor tipo Rushton.

Las variables analizadas fueron: densidad celular (células/mL), peso seco, contenido de lípidos, carbohidratos, proteínas y pigmentos (clorofila y carotenoides), velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación y, en experimentos selectos, el perfil de ácidos grasos.

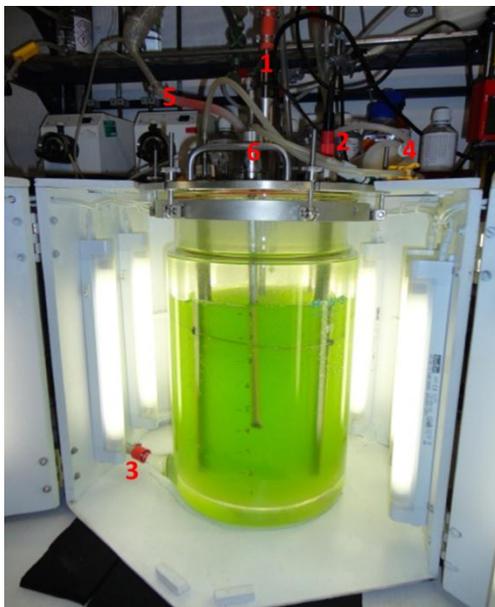
5.4.1.2 FBR 11 L

Posteriormente, se realizaron experimentos en un fotobiorreactor de tanque agitado con un volumen de trabajo de 11 L (**Figura 4**) con el objetivo de caracterizar el efecto del CO_2 en el número de células, tamaño y el contenido de lípidos en cultivos fototróficos de *N. oleoabundans*. El FBR contaba con el equipo para controlar la agitación, temperatura, flujo de gas y pH. Se utilizaron dos condiciones de cultivo, dentro del intervalo bajo de CO_2 : aire a 0.30 vvm (litros de gas/litro de medio/min, $0.0080 \text{ mmol CO}_2/\text{L}/\text{min}$) y 0.47 vvm de aire enriquecido con 0.65% de CO_2 ($0.2728 \text{ mmol CO}_2/\text{L}/\text{min}$).

Una vez inoculados bajo condiciones asépticas, los cultivos de *N. oleoabundans* en medio BBM, fueron monitoreados diariamente durante 7 días bajo las siguientes condiciones: temperatura de 25 °C, iluminación continua con luz blanca a una intensidad luminosa de $517 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ y agitación de 240 rpm con dos impulsores tipo Rushton.

Las variables analizadas fueron: densidad celular (células/mL), tamaño y contenido de lípidos de las células con la ayuda de un citómetro de flujo.

La geometría del sistema se describe en la **Tabla 7**.



1. Motor
2. Electrodo de pH
3. Entrada agua de enfriamiento
4. Entrada de aire
5. Salida de aire
6. Sensor de temperatura

Figura 4. FBR de 11L

5.4.2 Columna de burbujeo

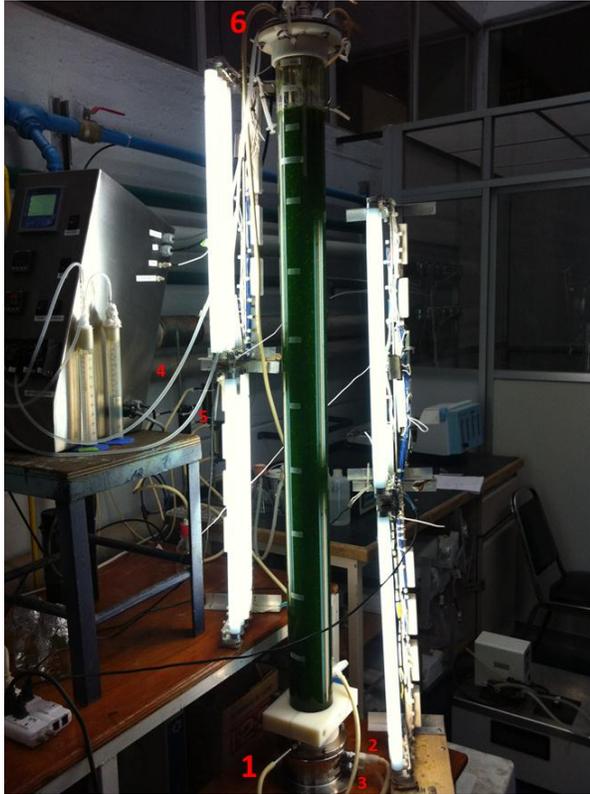
Se realizó el diseño y construcción de un FBR de 10.5 L (**Figura 5**). Para no afectar la penetración de la luz, se mantuvo el diámetro del FBR aproximadamente igual al FBR de 1 L, con lo cual se conservó la relación de la superficie expuesta a la luz con respecto al volumen de trabajo similar. De esta forma, los volúmenes relativos de las zonas con luz y oscuridad no se alterarían demasiado al aumentar el volumen del reactor.

El FBR es una columna de burbujeo fabricada con un módulo de acrílico con 153 cm de altura, diámetro externo de 4 pulgadas (10.16 cm) y grosor de pared de 3 mm, con una base de acero inoxidable de 7.2 cm que sirvió de soporte y como área de enfriamiento para la transferencia de calor, dando una altura total de 161 cm. De igual forma que el FBR de 1L, este sistema estuvo instrumentado para controlar la alimentación de gas (flujo y % de CO₂), pH y para medir la concentración de CO₂ y O₂ disuelto. Los sensores para medir el pH, el CO₂ y el O₂ disuelto se colocaron en la parte superior de la columna.

Los cultivos fueron inoculados a partir de matraces, de la misma forma que el reactor de 1 L. Una vez inoculados, los cultivos de *N. oleoabundans* en medio BBM, fueron

incubados bajo las condiciones siguientes: temperatura de 25 °C, pH 7 e iluminación continua con luz blanca a una intensidad luminosa de 50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.

Los cultivos experimentales fueron monitoreados diariamente durante 7 días. Las variables a analizar fueron las mencionadas previamente para el FBR de 1 L.



1. Entrada de aire
2. Entrada agua de enfriamiento
3. Salida agua de enfriamiento
4. Alimentación de ácido
5. Alimentación de base
6. Salida de aire

Figura 5. Columna de burbujeo.

5.5 Diseño experimental

Para disminuir el número de experimentos, se utilizó un diseño experimental equirradial hexagonal de superficie de respuesta.

Los métodos de superficie de respuesta proveen una forma eficiente de optimizar operaciones unitarias y procedimientos utilizando un número reducido de experimentos, evitando la redundancia. La metodología de la superficie de respuesta es un grupo de técnicas utilizadas en los estudios empíricos de las relaciones entre una o varias respuestas⁴⁸. En este caso, los factores a analizar fueron el porcentaje de CO_2 y el flujo total de gas.

El modelo de segundo orden, que cubre la región experimental, es un polinomio de segundo orden⁴⁸:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \epsilon$$

Existen diseños equirradiales de dos factores que consisten en colocar un número determinado de puntos espaciados por igual en un círculo. En el caso del diseño hexagonal, se localiza un punto central y se colocan 6 puntos alrededor de dicho punto (**Figura 6**). Para medir la variabilidad se utilizaron 3 repeticiones del punto central, dando un total de 9 experimentos⁴⁹. Uno de los factores (x_1), el porcentaje de CO_2 , contó con 5 niveles (0.03, 0.65, 1.27, 1.89 y 2.51%) y para el segundo factor, flujo total de gas (x_2) se utilizaron 3 niveles (0.13, 0.30 y 0.47 vvm).

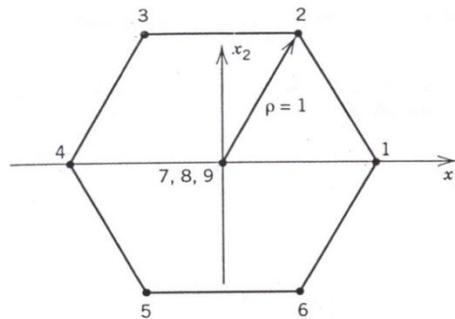


Figura 6. Puntos de diseño para el hexágono.

La matriz de diseño es⁴⁹:

$$D = \begin{matrix} & x_1 & x_2 \\ \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0.5 & \sqrt{0.75} \\ -0.5 & \sqrt{0.75} \\ -1 & 0 \\ -0.5 & -\sqrt{0.75} \\ 0.5 & -\sqrt{0.75} \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \end{matrix}$$

El resultado se representa en una gráfica de contorno donde se visualiza el valor óptimo. Cabe mencionar que los métodos de superficie de respuesta no revelan si el óptimo es local o global⁵⁰.

Los experimentos realizados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Puntos del diseño experimental hexagonal.

% CO ₂	Flujo de gas (vvm)	Flujo molar de CO ₂ (mmol CO ₂ /L/min)
2.51	0.30	0.3362
1.89	0.47	0.3993
0.65	0.47	0.1364
0.03	0.30	0.0040
0.65	0.13	0.0368
1.89	0.13	0.1070
1.27	0.30	0.1701

5.6 Métodos analíticos

5.6.1 Densidad celular

La densidad celular (células/mL) de los cultivos de la microalga *Neochloris oleoabundans* fue determinada mediante conteo directo en la cámara de Neubauer^{51, 52} con microscopio de luz utilizando el objetivo de 40X. En los casos en los cuales fuera necesario diluir la muestra, las diluciones se llevaron a cabo utilizando una solución de NaCl 0.85% (p/v).

La cámara de Neubauer está dividida en nueve cuadros grandes. Durante la determinación de la densidad celular de una muestra, se recomienda contar las células presentes en los cuatro cuadros grandes ubicados en las esquinas de la cámara. El conteo debe realizarse por duplicado.

Posteriormente, el cálculo de la concentración de células de los cultivos se realizó acorde con la ecuación:

$$Densidad\ celular = \frac{No.\ de\ células_{Prom} \cdot Dilución \cdot 10^4}{1\ mL}$$

donde: *Densidad celular* es la concentración de células en el cultivo (células/mL); *No. de células_{Prom}* es el promedio del número de células contadas por duplicado en los cuatro cuadros grandes de la cámara de Neubauer y *Dilución* es el factor de dilución de la muestra.

5.6.2 Peso seco

La biomasa en los cultivos de *N. oleoabundans*, en términos de peso seco, se cuantificó mediante gravimetría. Para ello se filtraron 10 – 15 mL de muestra húmeda,

utilizando filtros de membrana de nylon, previamente pesados, con un tamaño de poro de 0.45 μm . El filtro, junto con la muestra húmeda, se secó a 82 °C por un periodo de 48 h, siendo posteriormente enfriado en un desecador y pesado en una balanza analítica. El peso seco de la muestra fue determinado por gravimetría^{51, 52}.

5.6.3 Extracción y determinación de lípidos totales

La extracción de lípidos se realizó a partir de una muestra de 30 mL del cultivo. Las células contenidas en la muestra fueron inicialmente cosechadas mediante centrifugación a 14,580 x *g* durante 15 min, obteniendo con ello una pastilla celular. Ésta fue resuspendida en 2 mL de metanol (CH_3OH) y 1 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) con butil-hidroxitolueno (BTH) al 0.05% (p/v). De esta forma, las células quedaron inmersas en una mezcla metanol-diclorometano en una proporción 2:1, la cual fue agitada vigorosamente, cubierta y almacenada en refrigeración (4 °C) por un periodo mínimo de 12 h. Posteriormente, el paquete celular fue separado de la mezcla metanol:diclorometano, mediante centrifugación a 14,580 x *g* por 15 min. Con el fin de completar la extracción lipídica, la pastilla celular fue lavada en dos ocasiones más con 4 mL de una mezcla metanol:diclorometano 1:1. Todos los extractos obtenidos fueron combinados, de manera tal que el volumen final de extractos recolectado fue de aproximadamente 11 mL. Con el propósito de romper el equilibrio de la mezcla, se adicionaron 11 mL de agua desionizada, obteniéndose con ello dos fases: una fase orgánica que contiene los lípidos disueltos en el diclorometano y una fase metanol-agua o fase acuosa. Por otra parte, la pastilla celular libre de lípidos fue conservada para su uso posterior en la determinación del contenido de carbohidratos y proteínas^{27, 51}.

La cuantificación de los lípidos totales se realizó a partir de la fase orgánica obtenida. Con la finalidad de remover el agua remanente en la fase orgánica, ésta fue filtrada en sulfato de sodio anhidro, para lo cual se utilizó como soporte fibra de vidrio. Posteriormente, la fase orgánica libre de agua fue concentrada a 60 °C mediante el uso de un rotavapor y transferida a viales previamente pesados. La muestra fue secada con flujo directo de nitrógeno. Los viales con la muestra lipídica fueron almacenados en un desecador y pesados continuamente hasta obtener un peso constante. El contenido lipídico fue determinado por diferencia de peso²⁷.

5.6.4 Extracción y derivatización de ácidos grasos.

Para realizar la derivatización de ácidos grasos, primero se separaron los compuestos no saponificables de los ácidos grasos de la muestra obtenida de los lípidos totales. Para esto, se le agregó 2 mL de NaOH metanólico (0.3 N) y se calentó a 75 °C durante 2 h. Posteriormente, se procedió a extraer los ácidos grasos no saponificables con 5 porciones de hexano y se acidificó la fase metanólica remanente con 0.15 mL de HCl 6 N. Después, para extraer los ácidos grasos libres se realizaron 5 lavados con hexano. Se filtraron por separado los extractos lipídicos no saponificables y ácidos grasos en una cama de Na₂SO₄ anhidro, se secaron las muestras en rotavapor y se colectaron en viales a peso constante. Las muestras fueron secadas bajo flujo de nitrógeno y se determinó la cantidad de ácidos grasos por gravimetría^{10, 53}.

Los ácidos grasos libres fueron convertidos en metil-ésteres. Para esto, fueron mezclados con 0.3 mL de BF₃ metanólico y fueron calentados a 60 °C durante 9 min. Las muestras fueron enfriadas y se les agregaron 3 mL de hexano. Se lavaron 4 veces con 1 mL de solución saturada de NaCl y se desechó la fase acuosa. Los extractos fueron filtrados en una cama de Na₂SO₄ anhidro y fueron recibidos en viales⁵⁴. Las muestras fueron secadas bajo un flujo de nitrógeno, se resuspendieron en 300 µL de CH₂Cl₂ y el perfil de ácidos grasos fue analizado mediante cromatografía de gases (Agilent 6850, detector de ionización de flama) con una columna HP-INNOWax (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Se utilizó inyección “splitless” (1 µL) con una temperatura inicial del horno de 80 °C, la cual fue incrementada a 160 °C a 4°/min, después a 220 a 2°/min y, finalmente, incrementada a 10°/min hasta 240 °C y mantenida por 2 min. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo constante de 1 mL/min. Los ácidos grasos presentes en la microalga fueron identificados al comparar sus tiempos de retención con los correspondientes a los estándares (Food Industry FAME Mix #35077, Restek; 37 compuestos).

5.6.5 Determinación de carbohidratos y proteínas

El análisis del contenido de proteínas y de carbohidratos se realizó a partir de las pastillas celulares libres de lípidos obtenidas durante la etapa de extracción lipídica.

Para su evaluación, los paquetes celulares fueron resuspendidos en 1 mL de agua desionizada, agitados vigorosamente y separados en 2 alícuotas de 0.5 mL^{27, 51}.

Las alícuotas destinadas a la determinación del contenido de proteínas, fueron adicionadas con 3 mL de NaOH 1N y sometidas a un proceso de hidrólisis alcalina a 100 °C durante 1 h. La cuantificación de proteínas de las muestras hidrolizadas se realizó acorde con el método de Lowry *et al*^{27, 51, 52, 55}.

La otra alícuota fue empleada para la determinación de carbohidratos. Para esto se le agregaron 3 mL de HCl 2N y se les colocó en un baño en ebullición a 100 °C durante 1 h. La determinación del contenido de carbohidratos se realizó por medio del método del fenol-ácido sulfúrico^{27, 51, 56}.

5.6.6 Contenido de pigmentos: clorofila y carotenoides

La concentración de clorofila y carotenoides fue determinada utilizando un método espectrofotométrico. Un volumen de 1 – 2 mL de suspensión algal fue centrifugado a 12,800 x g durante 6 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla fue lavada con agua desionizada y resuspendida en 1 mL de metanol (99.9%) y se dejó incubar toda la noche a 4 °C. Los extractos fueron protegidos de la luz para evitar la decoloración de los pigmentos.

El contenido de pigmentos en el sobrenadante se calculó midiendo la absorbancia (A) con un espectrofotómetro y las siguientes ecuaciones⁵⁷⁻⁵⁹:

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) &= -8.3A_{650} + 16.5A_{665} \\ \text{Clorofila } b \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) &= 33.8A_{650} - 12.5A_{665} \\ \text{Clorofila Total} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) &= \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b \\ \text{Carotenoides} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) &= 4A_{480} \end{aligned}$$

donde: A_{652} , A_{665} y A_{480} es la absorbancia a 650, 665 y 480 nm, respectivamente.

5.6.7 Citometría de flujo

Para estimar el contenido de lípidos en el FBR de 11L, las células microalgales fueron teñidas con rojo nilo (RN) (9-dietilamino-5H-benzo[α]fenoxazina-5-ona, Sigma-

Aldrich) y fueron examinadas vía citometría de flujo. Cincuenta μL de una solución de RN y acetona (0.1 mg/mL) fueron añadidos a 1 mL de suspensión celular (10^5 - 10^6 cél/mL). Esta mezcla fue agitada suavemente en vortex e incubada por 10 min a 37°C en la oscuridad⁶⁰.

La fluorescencia de RN fue determinada usando un citómetro de flujo Lab Quanta™ SC MPL (Beckman Coulter, Fullerton, EUA) equipado con un láser de argón de 488 nm. Cuando el RN es excitado con este láser, exhibe una fluorescencia amarilla-dorada y roja al estar disuelto en lípidos neutros y polares, los cuales son detectados en los canales FL2 y FL3, respectivamente. Como control de autofluorescencia (AF) se utilizaron células sin teñir⁶⁰.

Además, las células teñidas con RN fueron adicionadas con SYTO® 9. Los colorantes SYTO® son sustancias permeables en la célula que tiñen los ácidos nucleicos y muestran fluorescencia al unirse a ellos. Pueden ser usadas para teñir ADN y ARN en células eucariotas vivas y muertas⁶¹. Esto permitió discriminar entre células y material no celular.

La correlación utilizada para esta microalga se muestra en la **Figura 7**. La fluorescencia RN normalizada corresponde a la suma de FL2/AF y FL3/AF⁶⁰.

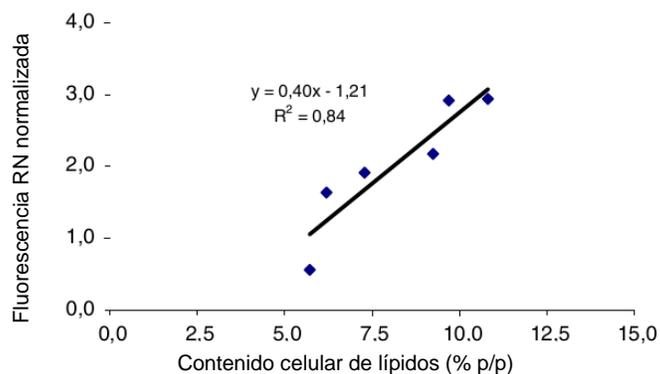


Figura 7. Correlación entre la fluorescencia RN y el contenido celular de lípidos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación del flujo molar de CO₂ en un FBR de 1 L

Se procedió a realizar las pruebas del diseño experimental mencionado en la sección 5.6.

6.1.1 Efecto en el crecimiento

Como se observa en las **Figuras 8A y 8B**, la mayor densidad celular (células/mL) se alcanzó bajo las condiciones de 0.0368 y 0.1364 mmol CO₂/L/min (0.65% CO₂ con 0.13 y 0.47 vvm, respectivamente), con un incremento en la densidad celular por encima de 150 x 10⁶ cél/mL. Éstas fueron seguidas por los cultivos con aire (0.0040 mmol CO₂/L/min), 0.1701 y 0.3966 mmol CO₂/L-min con incrementos de entre 108 y 120 x 10⁶ cél/mL. La condición con la que se alcanzó la menor densidad celular fue con 0.3362 mmol CO₂/L/min, condición con la que se utilizó el porcentaje más alto de CO₂ del diseño experimental (2.51%), donde el incremento celular fue ligeramente mayor a los 50 x 10⁶ cél/mL.

Cabe mencionar que estos resultados, incluso el mínimo alcanzado, es alto comparado con el reportado por Popovich *et al*⁶², quienes obtuvieron una densidad celular máxima de 40 x 10⁶ cél/mL utilizando un medio SWES (Agua de mar + extracto de suelo + sales) con un flujo molar de CO₂ de entre 0.074 - 0.104 mmol CO₂/L/min, una intensidad luminosa de 168 μE/m²/s (fotoperiodo 16:8 luz:oscuridad) y una concentración inicial de nitrato similar a la del medio BBM (3.5 mM y 2.94 mM, respectivamente).

Se encontró que los cultivos a flujos molares de 0.1070 y 0.3362 mmol CO₂/L/min presentaron tendencias no acordes con el resto de los cultivos en todos los parámetros analizados (ver mayores detalles adelante). Una posible explicación para el comportamiento anómalo en el cultivo con un flujo de 0.3362 mmol CO₂/L/min es que el cultivo se inició con una densidad celular mayor al resto de los experimentos, pudiendo tener un efecto adverso en el crecimiento. En ambos casos, el perfil de oxígeno disuelto en el reactor fue similar al resto de los cultivos (**Apéndice 10.6**).

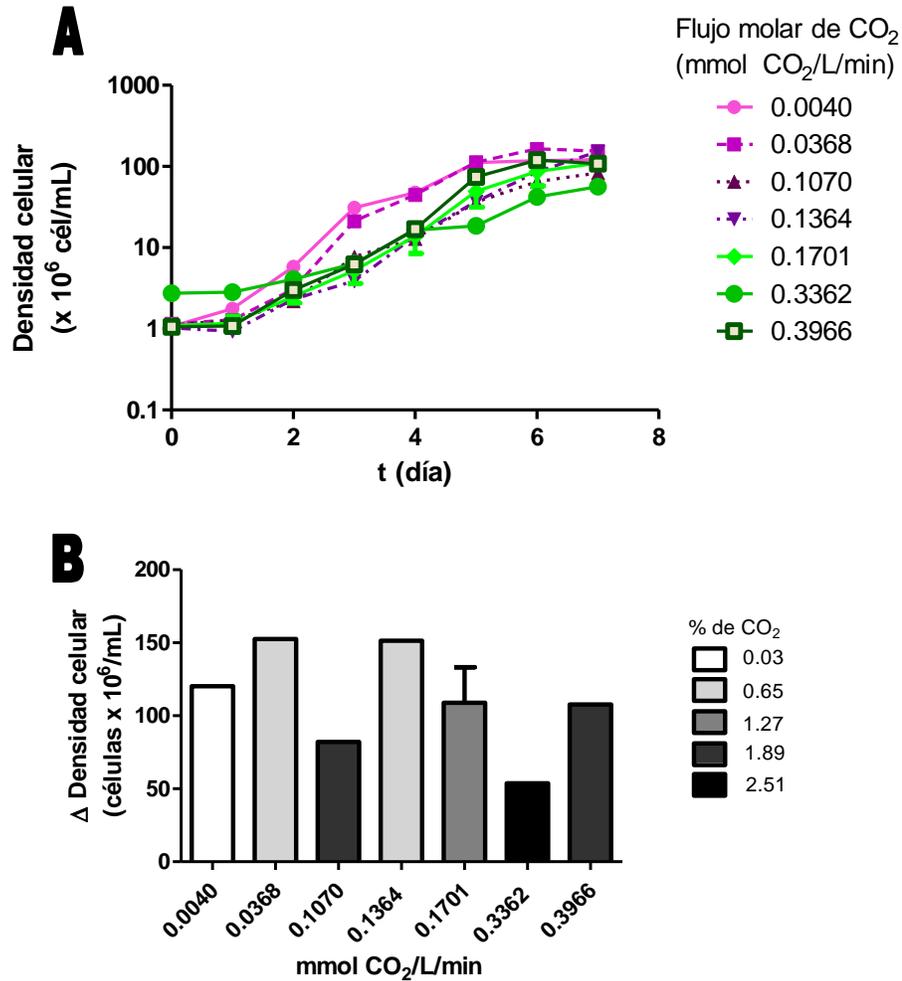


Figura 8. Efecto del flujo molar de CO₂ sobre el número de células durante 7 días de cultivo. **A)** Crecimiento en términos de número de células **B)** Incremento en el número de células.

Algunas especies de microalgas, cuando son cultivadas con una elevada concentración de CO₂ (10 veces mayor a la del medio ambiente, *i.e.* 0.03%), no son eficientes en la adquisición de carbono. Sin embargo, se ha encontrado que si esas mismas algas son cultivadas en un ambiente limitado en carbono (es decir, la cantidad de CO₂ no se encuentra en exceso), se vuelven muy eficientes en el consumo y fijación de CO₂. Se cree que esto se debe a la inducción de mecanismos de transporte, ya que también se ha reportado que la concentración de Rubisco no cambia durante la adaptación de condiciones de alta a baja concentración de CO₂⁴¹.

Matsuda y Colman⁶³ compararon dos especies de *Chlorella*, *C. ellipsoidea* (incapaz de crecer a altas concentraciones de CO₂) y *C. saccharophila* (capaz de crecer a altas concentraciones de CO₂), encontrando que la actividad del transportador de carbono inorgánico disuelto (CID) reduce el transporte de CO₂ y HCO₃⁻ bajo concentraciones altas de CO₂ y la actividad se incrementa al aclimatar las células con aire. Por su parte, *C. saccharophila* posee un transportador de CID insensible al efecto represivo de las altas concentraciones de CO₂, por lo que el transportador se expresa constitutivamente y la microalga es capaz de crecer bajo esas condiciones.

Con base en las cinéticas de crecimiento mostradas en la **Figura 8**, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ : basada en el incremento del número de células) y el tiempo de duplicación (t_d). Los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Efecto del flujo molar de CO₂ sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) de *N. oleoabundans*.

Flujo molar de CO ₂ (mmol/L/min)	μ (día ⁻¹)	t_d (día)
0.0040	0.930	0.74
0.0368	1.181	0.59
0.1070	0.788	0.88
0.1364	0.850	0.82
0.1701	0.884	0.79
0.3362	0.499	1.39
0.3966	0.941	0.74

La velocidad específica de crecimiento fue similar en casi todos los casos, excepto por el cultivo suministrado con 0.3362 mmol CO₂/L/min, donde la μ disminuyó en un 60% comparado con la condición donde se alcanzó la mayor velocidad específica de crecimiento (1.18 día⁻¹ en la condición de 0.0368 mmol CO₂/L/min).

En el **Apéndice 10.8** se muestra una comparación completa de los resultados obtenidos en este trabajo en comparación con los reportes de la literatura.

6.1.2 Efecto en la producción y productividad de masa celular o peso seco

El incremento de la masa celular (peso seco: DCW por las siglas en inglés de Dry Cell Weight) en todos los casos se encontró en un intervalo de 0.6 y 0.8 g/L después de 7 días de cultivo, dando una productividad (Q_x) de entre 88 y 115 mg_{DCW}/L/día (**Figura 9A**). Como se aprecia en la **Figura 9B**, el contenido promedio de masa celular por célula más alta se alcanzó en el cultivo suministrado con 0.3362 mmol CO₂/L/min.

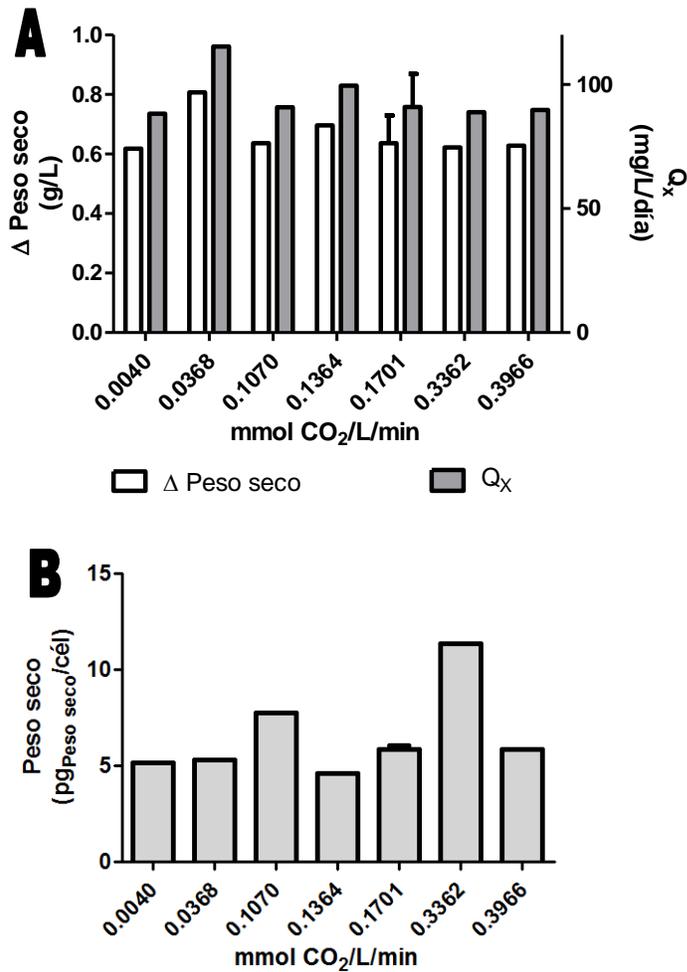


Figura 9. Efecto del flujo molar de CO₂ sobre **A)** el incremento y productividad de masa celular. **B)** la relación masa por célula de cultivos de *N. oleoabundans*

Esto parece indicar que el alto porcentaje de CO₂ suministrado en el cultivo de 0.3362 mmol CO₂/L/min (2.51%) generó algún tipo de estrés en la célula que promovió

el incremento de tamaño, pero no la división celular, como ocurre con la limitación de nitrógeno.

Las productividades de biomasa de *N. oleoabundans* más altas obtenidas en los experimentos son un 23% menores a las reportadas por Gouveia *et al*⁹, donde alcanzaron productividades de 150 mg_{DCW}/L/día en condiciones de cultivo similares (suficiencia de nitrógeno, 30 °C y flujo molar de 0.2009 mmol CO₂/L/min. Cabe mencionar que en experimentos previos desarrollados en nuestro laboratorio se encontró que la temperatura de 29 °C favorece el incremento en número de células de *N. oleoabundans* comparado con el cultivo a 25 °C (**Apéndice 10.9**) y, por tanto, los valores de productividad de biomasa reportados en la presente tesis pueden incrementarse a mayores temperaturas.

En todas las condiciones, se alcanzaron valores de peso seco mayores a los reportados por Garibay²⁸ en su tesis de maestría, quien alcanzó un valor de 0.35 g_{DCW}/L, para cultivos de *N. oleoabundans* alimentados con un flujo molar de CO₂ de 0.8929 mmol CO₂/L/min (2 vvm, aire enriquecido con 1% de CO₂, medio BBM, suficiencia de nitrógeno, ~25 °C, sin control de pH y con el doble de la intensidad luminosa (100 μE/m²/s)). Las productividades de peso seco obtenidas en la presente tesis son menores a las reportadas en la literatura (**Apéndice 10.8**), lo cual se debe a mayores cantidades de nutrientes (nitrógeno) en el medio de cultivo utilizado y/o mayor intensidad luminosa utilizada en otros trabajos.

6.1.3 Efecto en la producción y productividad de lípidos

La mayor producción de lípidos se alcanzó al utilizar un flujo molar de 0.0368 mmol CO₂/L/min, con un total de 0.32 g/L y una productividad (Q_{Lip}) de 45 mg_{Lip}/L/día. Como se mencionó previamente, parece que el CO₂ generó un estrés sobre la célula que favoreció la acumulación de lípidos. En el resto de las condiciones, la producción de lípidos estuvo entre 0.17 y 0.24 g/L, con productividades entre 25 y 35 mg/L/día (**Figura 10A y 10B y Tabla 10**). Estos valores corresponden a un porcentaje total de lípidos ($g_{Lip}/g_{DCW} \times 100$) de 28.5 – 39%, donde los valores más altos se alcanzaron en los cultivos con 0.0368 y 0.3966 mmol CO₂/L/min (**Figura 11**). Cabe recordar que estos valores fueron obtenidos bajo suficiencia de nitrógeno y no en condiciones de limitación

de este nutriente, estrategia utilizada para generar condiciones de estrés e incrementar el porcentaje de lípidos^{9, 28}.

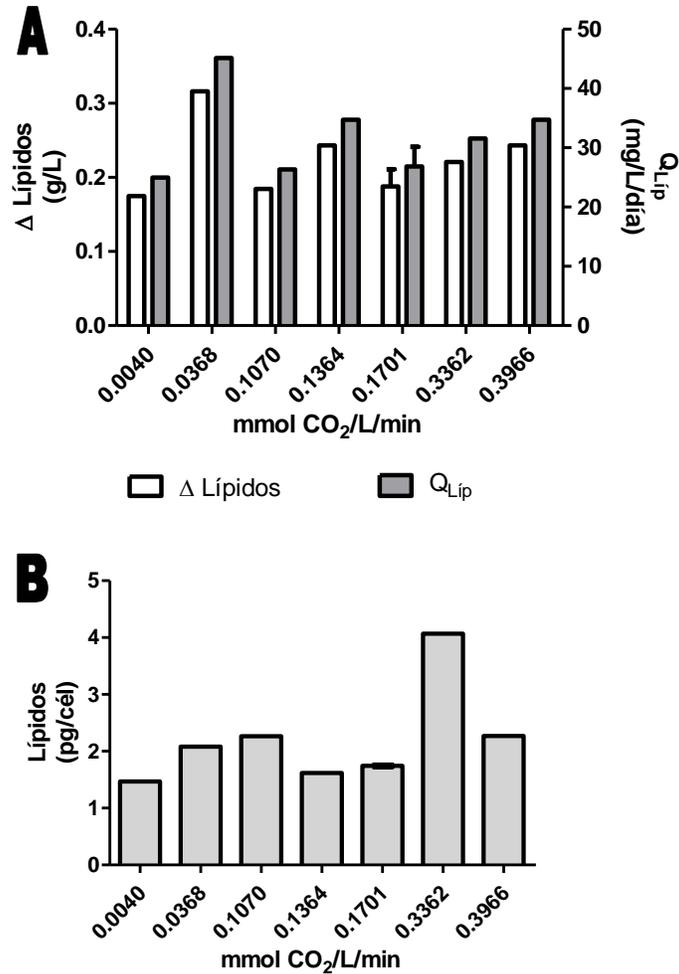


Figura 10. Efecto del flujo molar de CO₂ sobre **A)** la producción y productividad de lípidos. **B)** Contenido celular de lípidos en cultivos de *N. oleoabundans*.

Los resultados son similares a los reportados por Gouveia *et al*⁹, donde utilizaron un flujo de 0.2009 mmol CO₂/L/min, suficiencia de nitrógeno a 30 °C (Q_x = 37.66 mg/L/día), y obtuvieron un porcentaje de lípidos (g/g) de aproximadamente el 30%, es decir, similar al porcentaje alcanzado en todos los casos reportados en la **Figura 11** de esta tesis, también bajo suficiencia de nitrógeno. Por otro lado, los valores alcanzados en este trabajo fueron menores a los reportados por Garibay²⁸ (43.9%) bajo limitación de

nitrógeno (0.6 mM de NaNO₃), condición que favorece la acumulación de lípidos en las microalgas.

Tabla 10. Perfil de ácidos grasos (en porcentaje del total) bajo la condición de 0.1701 mmol CO₂/L/min.

Compuesto	Porcentaje
C16:0 (Palmítico)	11.25
C17:1 (Heptadecaico)	14.94
C18:0 (Esteárico)	0.15
C18:1 (Oleico)	6.11
C18:2 (Linoleico)	36.35
C18:3n3 (Linolénico)	24.08
No identificado	7.12

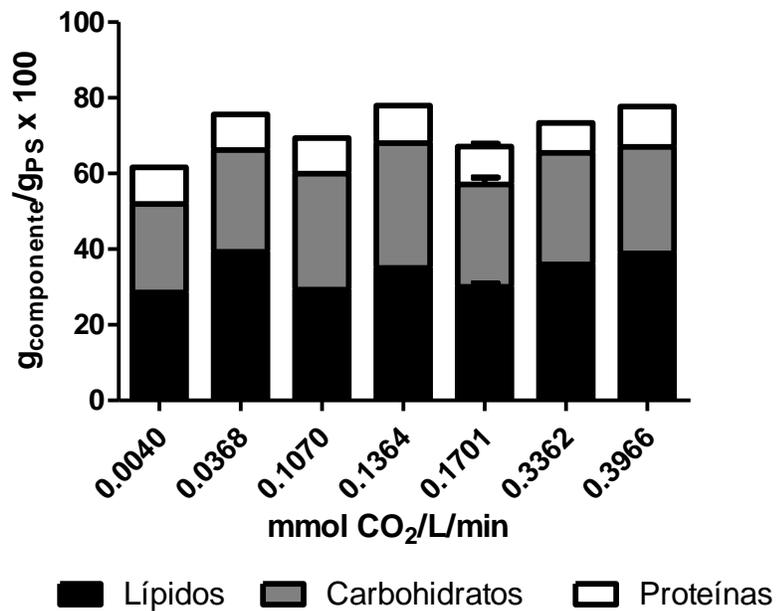


Figura 11. Efecto del flujo molar de CO₂ en la composición bioquímica final (expresada como porcentaje del peso seco) de *N. oleoabundans*.

Se ha reportado que el incremento en la concentración de CO₂ en la fase líquida, incrementa la velocidad específica de crecimiento y la actividad fotosintética de algunas microalgas (e.g. *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella tertiolecta*, *D. salina* y *Spirulina platensis*) y, en algunas especies, podría activar la síntesis *de novo* de ácidos grasos e inhibir su elongación e insaturación (e.g. *D. salina*)⁶⁸. Esta es una ventaja de las microalgas oleaginosas: podrían ser utilizadas para producir biodiesel y para mitigar el CO₂ del ambiente.

6.1.4 Efecto en el perfil de ácidos grasos

Finalmente, se decidió evaluar el perfil de ácidos grasos bajo la condición central evaluada en el diseño experimental (0.1701 mmol CO₂/L/min). Se encontró que, del total de los lípidos extraídos, aproximadamente el 38% correspondía a ácidos grasos. De los cuales, los ácidos grasos 18:2 y 18:3 se encuentran en mayor proporción (**Tabla 10**).

Existen varios reportes del perfil de ácidos grasos de esta microalga. Gouveia *et al*⁶ reportaron una cantidad mayor de C16:0 (19.35%), y reportan un ácido graso insaturado de 16 carbonos (16:4), que posiblemente corresponde con uno de los compuestos que no se pudo identificar por cromatografía de gases. Por su parte, Popovich *et al*⁶² reportaron un contenido mucho mayor de C18:1 (46%) y de C18:0 (6%). Las diferencias encontradas probablemente se deban al uso de distintas condiciones de cultivo, incluyendo los flujos molares de CO₂ empleados en este trabajo.

6.1.5 Potencial de producción de biodiesel a partir de cultivos de *N. oleoabundans*

Se calculó el potencial de producción de biodiesel considerando los datos del punto central del diseño experimental hexagonal (0.1701 mmol CO₂/L/min). Para el cálculo, se tomó una productividad de lípidos de 26.85 mg/L/día/, con un contenido de 38% de TAG, una eficiencia de transesterificación de 96% y una producción el 90% del año en estanques abiertos con una profundidad de 20 cm⁶⁹, se estima un potencial de producción de 7,449 L/ha/año.

Estos valores corresponden al 11% del máximo teórico (64,500 L/ha/año) de producción estimado para México⁶⁹. Sin embargo, la ventaja es que estos valores

pueden ser alcanzados utilizando aire, disminuyendo con esto los gastos implicados en el acoplamiento de los cultivos con una fuente rica en CO₂, y realizando sólo la etapa de producción, evitando la etapa de limitación de nutrientes, disminuyendo el tiempo de cultivo. Por último, cabe mencionar que el contenido de lípidos puede incrementarse mediante estrategias de limitación de nutrientes.

6.1.6 Efecto en la producción y productividad de carbohidratos

Las mayores producciones y productividades de carbohidratos se encontraron en las condiciones de flujo de 0.0368 – 0.1364 mmol CO₂/L/min. Las células cultivadas con aire, alcanzaron un valor 40% menor al más alto alcanzado (0.14 y 0.23 g/L en 0.0040 y 0.1364 mmol CO₂/L/min, respectivamente) (**Figura 12**).

El porcentaje final de carbohidratos radicó entre 23 y 33% ($\text{g}_{\text{Carbohidratos}}/\text{g}_{\text{DCW}} \times 100$, **Figura 11**), mientras que el contenido promedio por célula más alto se obtuvo en la condición de 0.3362 mmol CO₂/L/min, duplicando el valor alcanzado por el resto de los cultivos.

Garibay²⁸ encontró una productividad de carbohidratos menor en un 66% al alimentar el cultivo con CO₂ (0.8929 mmol CO₂/L/min), mientras que Popovich *et al*⁶² reportaron una productividad de carbohidratos del doble de los obtenidos en este trabajo (**Apéndice 10.5**).

La biomasa microalgal rica en carbohidratos o la residual (en el caso de microalgas verdes, éstos consisten principalmente de almidón) después de la extracción de lípidos, podría ser procesada para obtener algún producto de interés adicional. Por ejemplo, mediante una fermentación oscura para la producción de hidrógeno, biocombustible que ha tomado importancia en la actualidad al ofrecer una disminución en la contaminación y una mayor eficiencia combustible^{70, 71}, o bien, biogás con alto contenido de metano.

6.1.7 Efecto en la producción y productividad de proteínas

La producción de proteína después de 7 días de cultivos se encontró entre 0.05 y 0.08 g/L (**Figura 13A**) en todas las condiciones, correspondiente a aproximadamente el 10% del peso seco ($\text{g}_{\text{Proteína}}/\text{g}_{\text{DCW}} \times 100$, **Figura 11**).

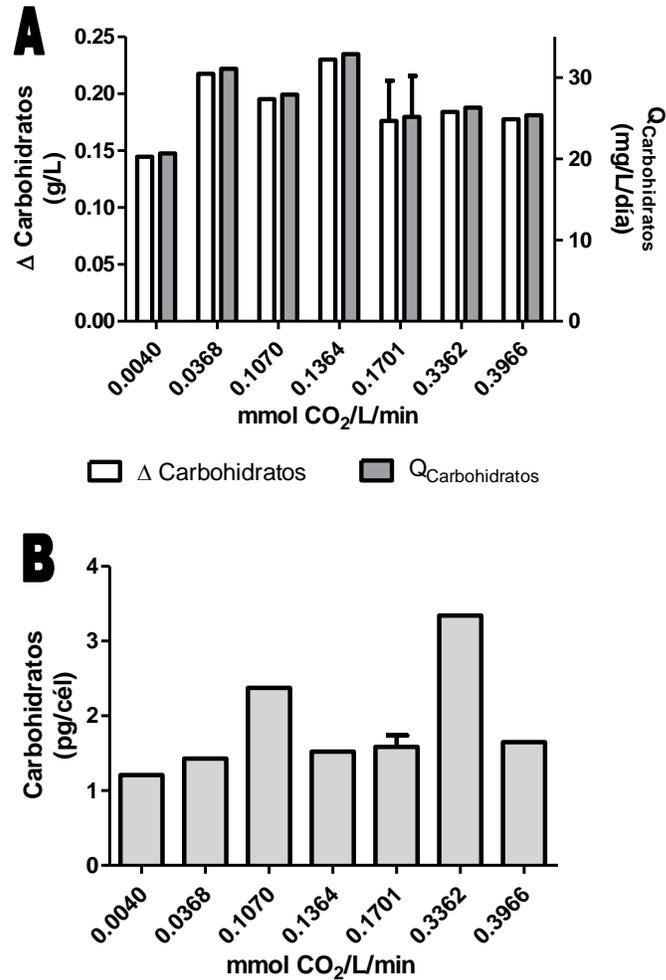


Figura 12. Efecto del flujo molar de CO₂ en **A)** la producción y productividad de carbohidratos **B)** el contenido celular de carbohidratos.

Existen reportes donde se ha encontrado que la proteína de las algas es de alta calidad y comparable con las proteínas vegetales convencionales. Sin embargo, debido a sus altos costos de producción y a la dificultad de incorporarla en preparaciones alimenticias que gusten a la población, las proteínas de las microalgas se vende como suplementos alimenticios y/o alimento para animales (aves de corral y peces)⁷².

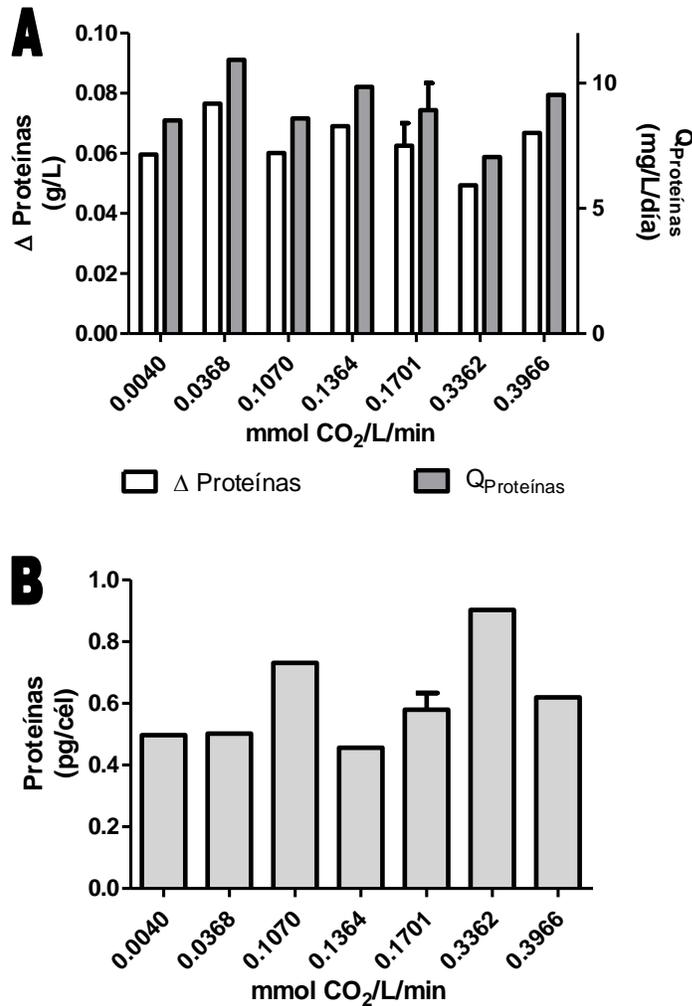


Figura 13. Efecto del flujo molar de CO₂ sobre **A)** la producción y productividad de proteínas **B)** el contenido celular de proteínas.

6.1.8 Efecto en la producción y productividad de pigmentos

Los lípidos útiles para la producción de biodiesel son los triacilglicéridos; sin embargo, las microalgas también poseen pigmentos, esteroides, glicol y fosfolípidos que no son útiles para la producción del biocombustible, pero poseen un valor comercial adicional⁵⁸.

La clorofila *a* es un pigmento verde-azul (absorbancia máxima: 660 – 665 nm) y la clorofila *b* es un pigmento verde-amarillo con absorbancia máxima de 642 a 652 nm⁷³. En general, la clorofila *a* es el principal tipo presente (70 – 84%) en organismos fotosintéticos⁵⁹.

Por su parte, los carotenoides representan un grupo de cromóforos biológicos con un rango de absorción entre 400 y 550 nm. Este grupo tiene varias funciones en el aparato fotosintético, como pigmentos accesorios para la captura de luz y su posterior transferencia a la clorofila *a*, como componentes estructurales dentro de los complejos cosechadores de luz y los centros de reacción pigmento-proteína y como protectoras contra el exceso de radiación y las especies reactivas de oxígeno⁷⁴.

Los resultados del contenido de pigmentos se muestran en la **Figura 14**. La menor cantidad de pigmentos se alcanzó en el cultivo con un flujo de 0.3362 mmol CO₂/L/min, alcanzando sólo el 50 – 63% del contenido de clorofila y el 55 – 75% del contenido de carotenoides del resto de los cultivos. Tal vez esto podría estar relacionado con el comportamiento anómalo de este cultivo.

Después de 7 días de cultivo, el contenido de clorofila correspondió entre los valores de 2.2 y 4.3% ($\text{g}_{\text{Clorofila}}/\text{g}_{\text{DCW}} \times 100$) y los de carotenoides entre 0.4 y 0.73% ($\text{g}_{\text{Carotenoides}}/\text{g}_{\text{DCW}} \times 100$), valores considerados dentro de los lípidos totales.

En estudios realizados por Pruvost *et al*⁶⁸, se encontró un contenido de clorofila de 3.5%, valor similar al encontrado en todos los cultivos, con excepción del cultivo alimentado con 0.3362 mmol CO₂/L/min. Cabe mencionar que en dicho trabajo, el contenido de nitrógeno, componente importante de dicho pigmento, en el medio de cultivo fue de casi 9 veces mayor (26 mM comparado con 2.94 mM).

6.2 Análisis de resultados del diseño experimental hexagonal y modelos de predicción

Con base en los resultados anteriores, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental hexagonal. Cabe recordar que los métodos de superficie de respuesta son un conjunto de técnicas utilizadas en estudios empíricos para relacionar una o varias respuestas con una serie de variables de control⁴⁸. A continuación se reportan los modelos, los valores de ajuste (R^2) y las gráficas de contorno obtenidas.

Las variables de respuesta analizadas fueron: el cambio en la densidad celular (número de células), producción de masa (peso seco), de lípidos, carbohidratos y proteínas. Para las 4 variables evaluadas, se encontró que el porcentaje de CO₂ y el flujo total de gas no tenían un efecto significativo (datos de ANOVA no mostrados). El

buen crecimiento obtenido mediante el uso del intervalo bajo de flujo molar de CO_2 ofrece la ventaja de que se puede utilizar un flujo de aireación bajo, lo cual implica una disminución de costos, con un bajo contenido de CO_2 , quitando la limitante de que el sistema debe acoplarse a una fuente rica en CO_2 .

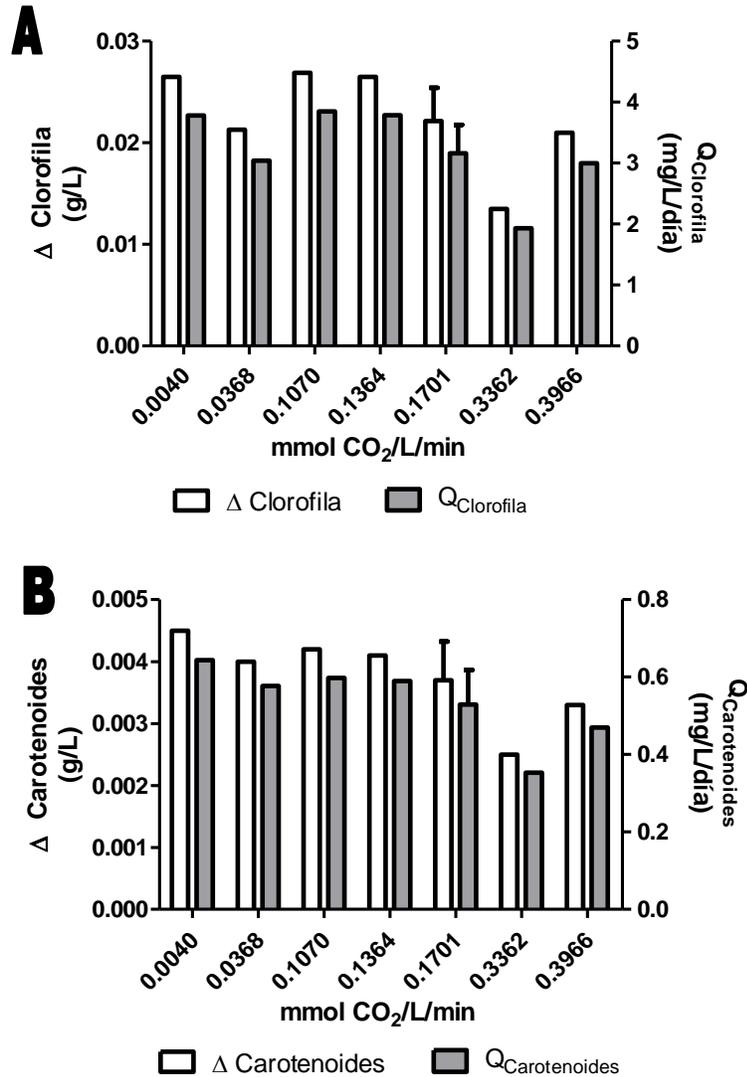


Figura 14. Efecto del flujo molar de CO_2 sobre la cantidad de pigmentos. **A)** Clorofila total. **B)** Carotenoides.

Adicionalmente, se probaron las variables de respuesta masa celular y cantidad de lípidos por célula. Los resultados se muestran a continuación.

6.2.1 Masa celular

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) para el peso seco final por célula, se encontró que el porcentaje de CO₂ (A) tiene una mayor influencia que el flujo total de gas (B), lo cual se aprecia en la **Tabla 11** y **Figura 15**, donde se señalan las regiones favorables para elevadas magnitudes de la respuesta evaluada.

En la gráfica se aprecia que esta variable es favorecida por porcentajes altos de CO₂ y flujos totales de gas bajos. Lo cual es lógico, ya que un flujo total de gas bajo y un alto porcentaje de CO₂ favorecen la transferencia de dicho gas hacia el líquido: un flujo bajo permite que el tiempo de residencia de las burbujas sea mayor, mientras que un alto porcentaje de CO₂ permite que la diferencia entre la concentración de CO₂ en la interfase gas – líquido y la concentración en el seno de la solución sea mayor.

Asimismo, permite la obtención de un modelo apropiado para calcular la mayor biomasa celular final, cuya ecuación final en términos de factores codificados es:

$$\text{Biomasa celular final } \left(\frac{\text{pg}}{\text{cél}}\right) = 5.82 + 2.67A - 0.75B - 0.70AB + 2.42A^2 - 0.74B^2$$

Tabla 11. Análisis de varianza del efecto del porcentaje de CO₂ y el flujo total de gas en la biomasa celular final (pg/cél).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	32.29	5	6.46	14.91	0.0249
A – CO ₂	21.36	1	21.36	49.31	0.0059
B – Flujo de gas	1.68	1	1.68	3.87	0.1439
AB	0.37	1	0.37	0.85	0.4253
A ²	7.02	1	7.02	16.21	0.0275
B ²	0.66	1	0.66	1.51	0.3065
Residuos	1.30	3	0.43		
<i>Falta de ajuste</i>	1.05	1	1.05	8.32	0.1022
<i>Error puro</i>	0.25	2	0.13		
Total	33.59	8			
R²	0.9613				

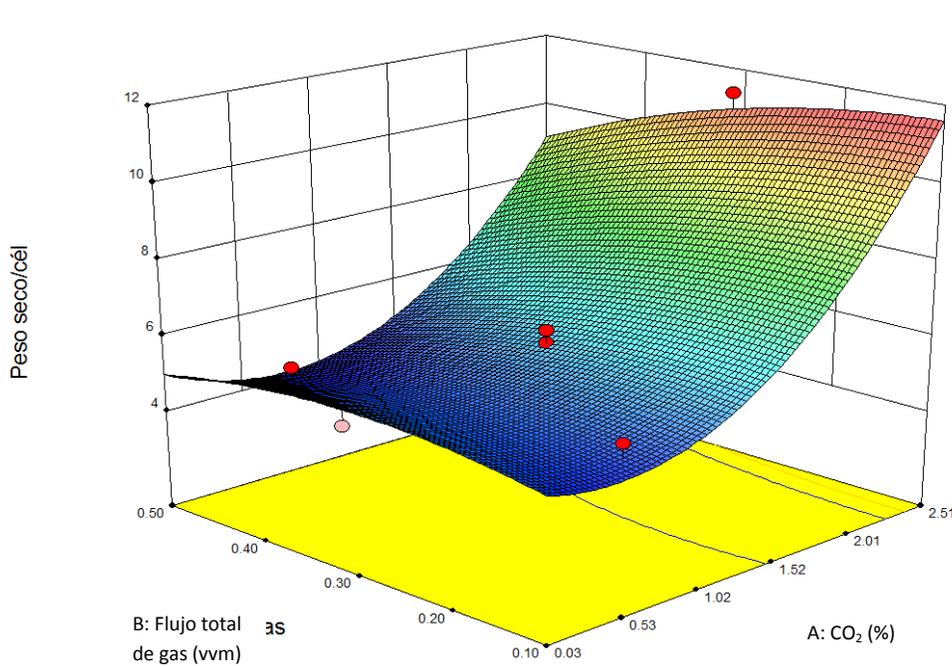


Figura 15. Diagrama de curvas de nivel en 3 dimensiones del peso seco por célula como respuesta a diferentes porcentajes de CO₂ y flujos de gas. En rojo se señala la región donde se favorece la masa celular.

6.2.2 Contenido celular de lípidos

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) para el contenido final de lípidos por célula, se observa que el porcentaje de CO₂ (A) tiene una mayor influencia que el flujo total de gas (B), lo cual se aprecia en la **Tabla 12** y **Figura 16**, donde se señalan en rojo las regiones favorables para mayores magnitudes de la respuesta evaluada. Se observa que esta variable se favorece por porcentajes altos de CO₂ y se aprecia un ligero efecto por flujos de gas elevados. El mayor efecto por parte de los altos porcentajes de CO₂ podría deberse a una mejor transferencia del gas hacia el líquido.

Asimismo, permite la obtención de un modelo apropiado para calcular el mayor contenido final de lípidos por célula, cuya ecuación final en términos de factores codificados es:

$$\text{Contenido lipídico final } \left(\frac{\text{pg}}{\text{cél}}\right) = 1.77 + 1.01A - 0.13B + 0.27AB + 1.01A^2$$

Tabla 12. Análisis de varianza del efecto del porcentaje de CO₂ y el flujo total de gas sobre el contenido lipídico final (pg/cél).

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor de F	Probabilidad de F
Modelo	4.42	4	1.11	8.36	0.0318
A – CO ₂	3.04	1	3.04	22.95	0.0087
B – Flujo de gas	0.053	1	0.053	0.40	0.5604
AB	0.054	1	0.054	0.41	0.5563
A ²	1.28	1	1.28	9.67	0.0359
Residuos	0.53	4	0.13		
Falta de ajuste	0.53	2	0.26	183.85	0.0054
Error puro	0.00286	2	0.001431		
Total	4.95	8			
R²		0.8931			

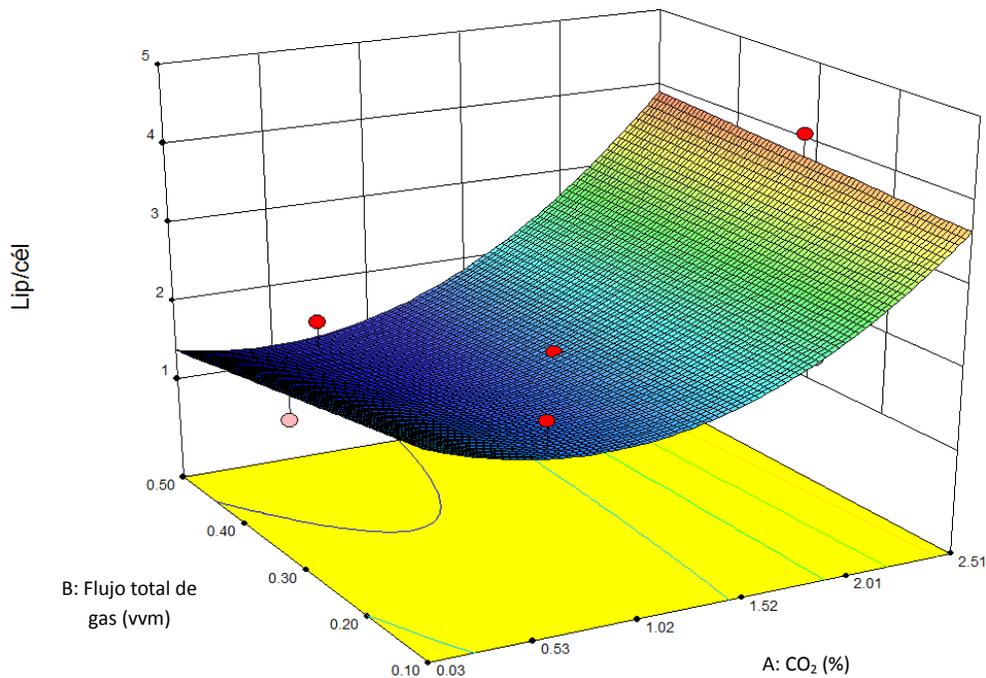


Figura 16. Diagrama de curvas de nivel en 3D del contenido de lípidos por célula como respuesta a diferentes % de CO₂ y flujos de gas. En rojo se señala la región donde se favorece el contenido celular de lípidos.

6.3 Evaluación del porcentaje de CO₂ sobre el crecimiento de *N. oleoabundans*

Después de realizar las pruebas del diseño experimental propuesto en la **Tabla 8**, y dado que no hay un efecto claro del flujo molar de CO₂ sobre los diferentes parámetros evaluados, se decidió probar flujos molares de CO₂ por encima de los evaluados en el diseño experimental (flujo intermedio y alto). Para estos experimentos se decidió mantener constante el flujo total de gas (0.5 vvm), y se evaluó el porcentaje de CO₂ en tres valores: 0.03, 2.51 y 5.00%. Además, estos cultivos fueron adicionados con antibióticos (amoxicilina 500 mg/L con ácido clavulánico 125 mg/L), como medida precautoria para reducir la contaminación por microorganismos distintos a la microalga. La amoxicilina es un antibiótico β-lactámico, en particular una amino penicilina de amplio espectro, que interrumpe la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana. El ácido clavulánico, por su parte, amplía el rango de acción de la amoxicilina al inhibir a las β-lactamasas, enzimas que a ciertos microorganismos les confiere resistencia contra este antibiótico^{75, 76}.

Como se observa en la **Figura 17**, bajo la concentración más alta de CO₂ (5.0%) no se observó crecimiento. Por su parte, Gouveia *et al*⁹ reportaron que suplementar CO₂ al flujo de gas para el cultivo en lote de *N. oleoabundans* favorece la productividad de biomasa; sin embargo, la diferencia en los resultados probablemente se deba a que la cantidad de mmoles de CO₂/L/min suplementados fue menor a la utilizada en este experimento (0.2009 mmol CO₂/L/min).

Con base en las cinéticas de crecimiento mostradas en la **Figura 17**, se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (t_d) o la velocidad de muerte. Los resultados se muestran en la **Tabla 13**. La productividad de biomasa (P_x) se calculó con base en el cambio en el peso seco durante los 7 días de cultivo.

La productividad de biomasa de *N. oleoabundans* obtenida en el cultivo con suministro de aire es superior a la reportada por Gouveia *et al*⁹ (0.03 g/L/día) en condiciones de cultivo similares (suficiencia de nitrógeno, 26 °C y aire).

A partir de estos resultados se puede concluir que a flujos molares de CO₂ mayores a 0.5603 mmol CO₂/L/min (flujo intermedio), se observa un efecto adverso, reduciendo la capacidad de crecer y ocasionando la muerte de las células de *N. oleoabundans* a un flujo molar alto (1.1161 mmol CO₂/L/min). Esto implica que, con esta microalga,

incrementar los flujos molares por encima de 0.5603 mmol CO₂/L/min podría tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento.

El hecho de que esta microalga sea capaz de crecer de manera adecuada a bajos flujos molares de CO₂ (incluso con los niveles del ambiente) implicaría una disminución en el costo de producción, al no requerir de algún sistema especial para el manejo y captura de CO₂ de fuentes externas.

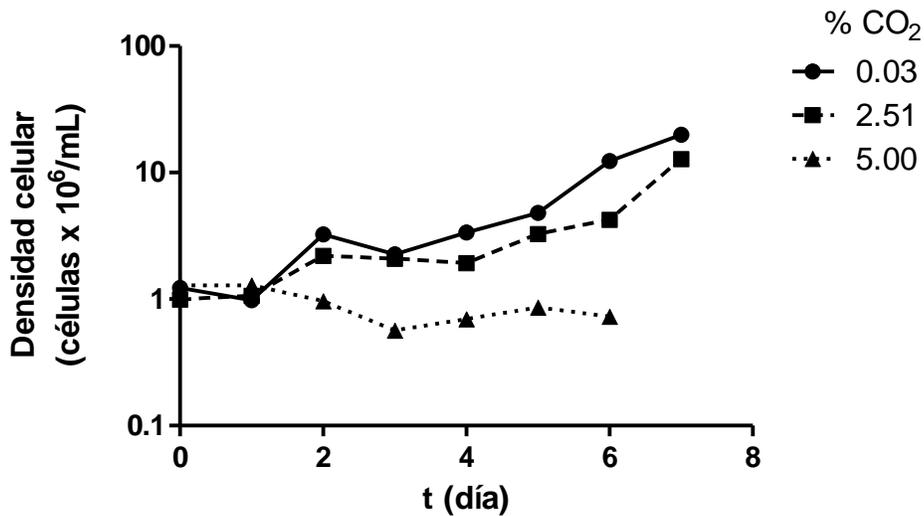


Figura 17. Efecto del porcentaje de CO₂ sobre la densidad celular. Los experimentos se realizaron con un flujo total de gas de 0.5 vvm.

Tabla 13. Resultados del efecto del CO₂ sobre la biomasa de cultivos de *N. oleoabundans* (0.5 vvm, 25 °C, pH 7).

% de CO ₂	Flujo molar (mmol CO ₂ /L/min)	μ (día ⁻¹)	t_d (día)	Velocidad de muerte (día ⁻¹)	P_x (g/L/día)
0.03	0.0078	0.32	2.13	–	0.05
2.51	0.5603	0.45	1.53	–	–
5.00	1.1161	–	–	0.41	–

6.4 Evaluación del efecto del CO₂ en un tanque agitado de 11 L

6.4.1 Efecto en el crecimiento

Se realizaron experimentos en un fotobiorreactor de tanque agitado, con un volumen de trabajo de 11 L, con el objetivo de caracterizar el efecto del CO₂ en el número y tamaño de células y el contenido de lípidos (por citometría de flujo) en cultivos fototróficos de *N. oleoabundans*.

Como se muestra en **Figura 18**, el número de células/mL alcanzada después de 7 días bajo las dos condiciones probadas fue similar. Con aire (0.0080 mmol CO₂/L/min) el incremento total fue de 62.5×10^6 cél/mL, mientras que el cultivo con aire enriquecido con CO₂ (0.2728 mmol CO₂/L/min) fue un 20% mayor, con 77.3×10^6 cél/mL.

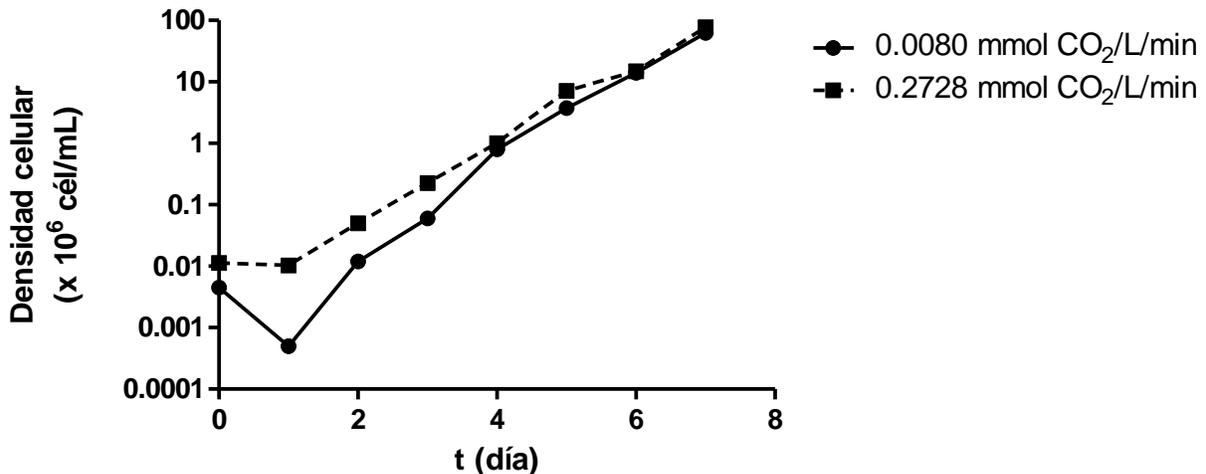


Figura 18. Evaluación del incremento en el número de células como función del flujo molar de CO₂ en un FBR de 11L.

En lo que se refiere a las velocidades específicas de crecimiento, el cultivo alimentado sólo con aire alcanzó un valor de 1.7116 días^{-1} (t_d de 0.4050 días), mientras que el cultivo alimentado con CO₂ alcanzó un valor de 1.4873 día^{-1} . Estos valores son mayores que los obtenidos en el diseño experimental hexagonal. Esto probablemente se debió a que la intensidad luminosa fue diez veces mayor a la utilizada en el tanque agitado de 1 L (517 y $50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, respectivamente). También cabe mencionar que estos experimentos se realizaron como parte de un estancia corta en Alemania, donde

no se contó con el equivalente a la infraestructura que se tiene en el IBt-UNAM y, por tanto, no fue posible desarrollar los inóculos de la misma forma y los cultivos en el FBR de 11 L se iniciaron con $0.005 - 0.01 \times 10^6$ en lugar de 1×10^6 cél/mL.

Con respecto a la producción de biomasa, en el cultivo con aire se alcanzaron 0.2840 g/L, mientras que el cultivo alimentado con $0.2728 \text{ mmol CO}_2/\text{L}/\text{min}$ se obtuvo un 35% más (0.4382 g/L), lo cual corresponde a una masa celular promedio de 4.54 y 5.67 pg/cél, respectivamente. Estos valores son similares a los alcanzados en el FBR de 1 L, con excepción de las condiciones de 0.1070 y $0.3362 \text{ mmol CO}_2/\text{L}/\text{min}$, que, como se mencionó previamente, presentaron un comportamiento distinto al resto de los cultivos.

6.4.2 Efecto en el contenido de lípidos estimado por citometría de flujo

Como se explicó previamente, se utilizó el Rojo Nilo (RN) con el objetivo de estimar el contenido de lípidos en las células microalgales. Lopes da Silva *et al*⁶⁰ reportaron una correlación entre la fluorescencia total del RN y el contenido de lípidos para esta microalga (**Figura 7**). Desafortunadamente, al utilizar dicha ecuación se encontró una falta de correlación entre los dos valores bajo las condiciones evaluadas por nosotros. Por esto, se decidió presentar los valores de forma distinta. Estos valores están relacionados con la cantidad de lípidos de almacenamiento (TAG) y permiten realizar una comparación entre ambas condiciones.

En la **Tabla 14** se muestran los valores del citómetro de flujo. Los resultados fueron normalizados al restar la auto-fluorescencia (AF) de los valores obtenidos con RN y SYTO 9®. Además, los valores de FL2 fueron normalizados utilizando el Volumen Electrónico (VE), debido a que las células más grandes deberían mostrar mayor fluorescencia y viceversa.

Como se aprecia en la **Tabla 14**, las células que crecieron con aire enriquecido con CO_2 tuvieron una fluorescencia FL2 (Syto® + RN) 5 veces mayor, lo cual podría corresponder con un mayor contenido de lípidos de almacenamiento, y estaría acorde con los resultados obtenidos en el FBR de 1 L, donde el diseño experimental indicó un efecto del porcentaje de CO_2 en la masa celular.

Tabla 14. Valores promedio del citómetro de flujo en el día 7 de cultivo. VE: Volumen electrónico; RN: Rojo Nilo; AF: Auto-fluorescencia.

mmol CO ₂ /L/min	FL2 (Syto® + RN)	AF	FL2 – AF	FL2/VE
0.0080	94.69	1.4000	93.29	0.26
0.2728	127.90	6.6300	121.27	0.41

6.5 Evaluación del efecto del CO₂ en una columna de burbujeo

Por último, se realizó el diseño y construcción de una columna de burbujeo con un volumen de trabajo de 10.5 L.

El objetivo de utilizar este sistema fue el de realizar un escalamiento a un volumen 10 veces mayor. Para esto, el FBR de 10 L fue diseñado con un diámetro similar al utilizado en el tanque agitado de 1 L (94 mm), de tal forma que la relación área donde incide la luz con respecto al volumen se mantuviera constante (**Tabla 7**). Sin embargo, al hacer el escalamiento no se pudo mantener la similitud geométrica de los sistemas por cuestiones prácticas. Por esto, se decidió eliminar la agitación y utilizar dos filtros de acero sinterizado para la mejor dispersión del gas y mezclado, introducidos en la parte inferior del FBR. Los sensores para medir el pH, temperatura, O₂ y CO₂ disuelto se colocaron en la parte superior del reactor. La temperatura (25 °C) fue controlada mediante la recirculación continua de agua en la base metálica de la columna.

Una vez construido el FBR de columna de burbujeo, se realizó el escalamiento y se evaluó el crecimiento y la composición bioquímica de *N. oleoabundans* en dicha columna. La condición evaluada fue el punto central del diseño experimental hexagonal (0.3 vvm con 1.27% CO₂; flujo molar de 0.1701 mmol CO₂/L/min).

6.5.1 Efecto sobre el crecimiento

Como se aprecia en la **Figura 19**, al sexto día de cultivo se alcanzó una densidad celular ligeramente mayor a los 150 x10⁶ cél/mL, valor que corresponde al más alto alcanzado en el FBR de 1 L. Probablemente, las células se limitaron en algún otro

nutriente (e.g. luz o algún componente del medio de cultivo como el nitrato) después de alcanzar este valor y esto impidió una mayor proliferación celular.

La velocidad específica de crecimiento alcanzada fue de 0.829 día^{-1} , similar a la obtenida con el mismo flujo molar de CO_2 ($0.1710 \text{ mmol CO}_2/\text{L}/\text{min}$) en el FBR de 1L (0.884 día^{-1}).

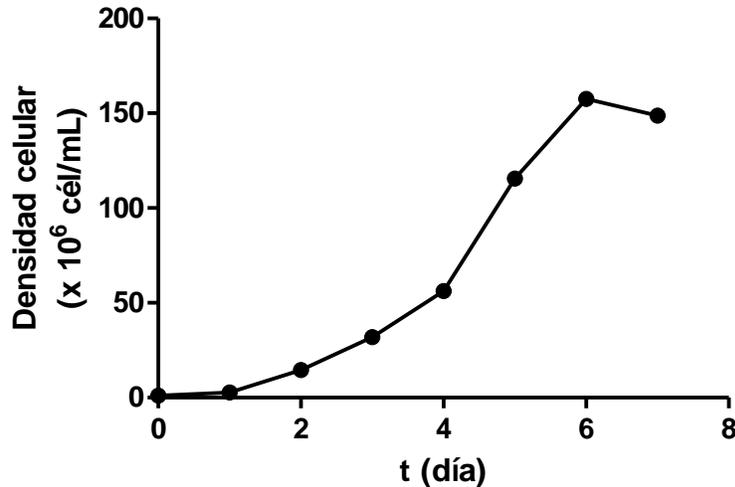


Figura 19. Evaluación de la densidad celular en un FBR de 10.5 L operado como columna de burbujeo.

6.5.2 Efecto sobre la composición bioquímica

En este sistema se alcanzó el contenido lipídico mayor. A pesar de que la producción de masa celular fue menor a la alcanzada en el cultivo con el mismo flujo molar en el FBR de tanque agitado de 1L, la producción de lípidos fue mayor (**Figura 20**) debido a que las células acumularon un 50.31% de lípidos al séptimo día de cultivo.

La cinética entre el sexto y séptimo día indica que el cultivo entró en una fase estacionaria, probablemente por el agotamiento de la fuente de nitrógeno, lo cual, como ha sido reportado por Garybay²⁸, favorece la acumulación de lípidos totales.

El contenido de carbohidratos fue similar (27.12 y 25.00%, respectivamente) y el contenido de proteínas fue 43% mayor al del cultivo en 1 L. Sólo se reporta un experimento en esta escala ya que, en otros intentos de realizar el experimento, éste se

contaminó y, por cuestiones de tiempo, no fue posible realizar un mayor número de réplicas.

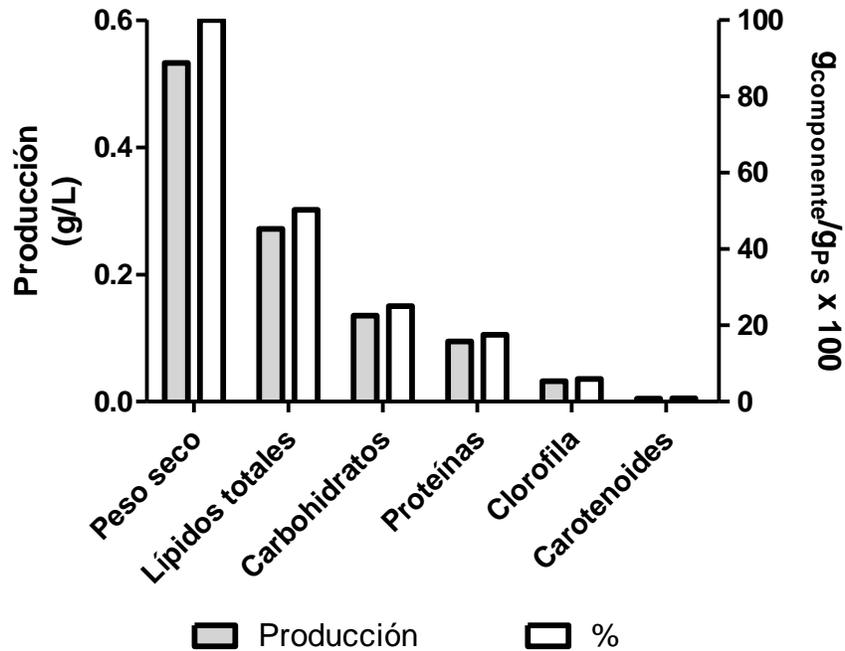


Figura 20. Evaluación de la composición bioquímica en cultivos de *N. oleoabundans* en un FBR de 10.5 L operado como columna de burbujeo.

Lopes da Silva *et al*⁶⁰ reportaron que el uso de limitación de nitrógeno en conjunto con el suministro de aire enriquecido con CO₂ permitió un total de 52% de lípidos, adicionalmente en cultivos con el mismo flujo molar, pero sin limitación de nitrógeno, se alcanzó solamente el 30% de lípidos.

Como se explicó previamente, el CO₂ tiene un impacto en el pH (lo disminuye) y la acumulación de oxígeno generado durante la fotosíntesis puede inhibirla⁴³. Por esto, se decidió monitorear estos tres parámetros. En la **Figura 21** se aprecia que el oxígeno incrementó durante los primeros días, para luego disminuir hasta llegar al valor de saturación. Esto podría deberse a una disminución en la actividad fotosintética o a la proliferación de una contaminación dentro del cultivo. Cabe mencionar que estos valores de oxígeno disuelto se tomaron en la parte superior del reactor y no se realizó la

determinación de gradientes dentro de la columna. El pH se mantuvo estable durante los 7 días de cultivo después del ajuste inicial.

En lo que se refiere al CO_2 , en la **Figura 21** se observa un incremento el primer día y para luego mantenerse en un valor de 6 mg/L, lo cual coincide con el inicio del incremento celular. Sin embargo, el CO_2 nunca se redujo a un valor cercano a cero, lo que parece indicar que el CO_2 no es el nutriente limitante en el cultivo.

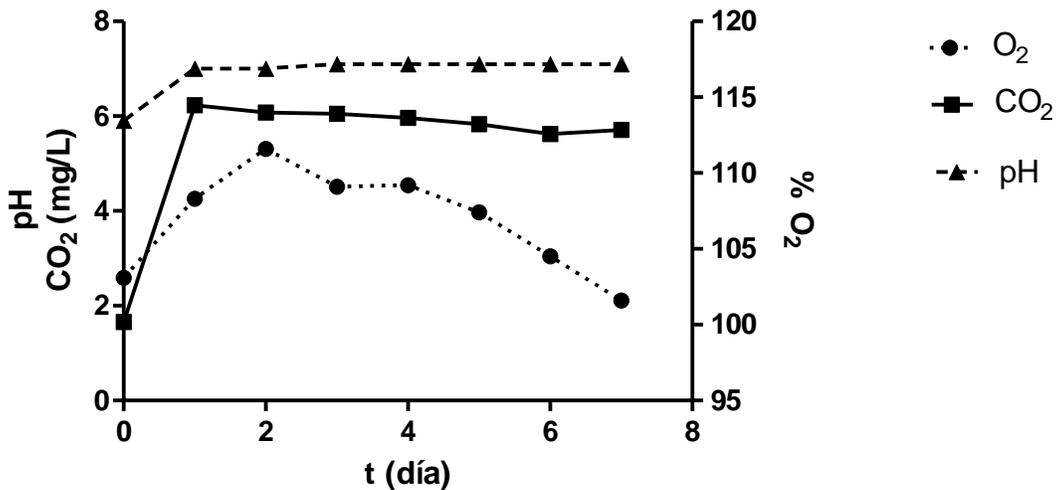


Figura 21. pH y concentración de CO_2 y O_2 en el medio de cultivo en el FBR de 10.5 L

Después de analizar los resultados obtenidos en los 3 fotobiorreactores utilizados, se encontró que, a pesar de la disimilitud geométrica entre ellos (**Tabla 7**) y los cambios en la intensidad luminosa (en el FBR de tanque agitado de 11 L se utilizó 11 veces la intensidad luminosa utilizada para el FBR de tanque agitado de 1 L y la columna de burbujeo de 10.5 L), al mantener constante el flujo molar de CO_2 , o variarlo dentro del intervalo de 0.0040 y 0.5603 mmol $\text{CO}_2/\text{L}/\text{min}$, se observa una tendencia similar en el crecimiento y composición bioquímica de la microalga, lo cual ofrece una ventaja al realizar el escalamiento del cultivo. Además de permitir predecir la composición macromolecular de *Neochloris oleoabundans*.

7. CONCLUSIONES

1. En general, los resultados obtenidos indican que el crecimiento de la microalga y su composición macromolecular, con un alto contenido de lípidos (33%), no varían significativamente en los bajos intervalos de flujo molar de CO₂ evaluados, lo cual ofrece la ventaja de utilizar el CO₂ presente en el aire, sin requerir acoplar el sistema a una fuente rica en CO₂.
2. El análisis de varianza del diseño experimental permitió determinar que el porcentaje de CO₂ y el flujo total de gas, en el intervalo bajo, no tienen un efecto significativo sobre el cambio en la densidad celular y la producción de biomasa, lípidos, carbohidratos y proteínas. Además, se encontró que el porcentaje de CO₂ tiene una mayor influencia sobre el peso seco y la cantidad de lípidos a nivel celular, debido probablemente a una mejor transferencia gas-líquido.
3. A flujos molares mayores a 1.1161 mmol de CO₂/L/min, el CO₂ resulta tóxico para la microalga e induce su muerte.
4. Los resultados obtenidos por citometría de flujo, con células provenientes del FBR de tanque agitado de 11 L, sugieren que hay un mayor contenido de lípidos de almacenamiento en el cultivo enriquecido con CO₂ (0.2728 mmol CO₂/L/min) en comparación con el suministrado con aire. Sin embargo, se requieren más estudios de este tipo para poder correlacionar cuantitativamente la fluorescencia con el contenido lipídico.
5. En la columna de burbujeo de 10.5 L, *Neochloris oleoabundans* creció hasta alcanzar una densidad celular similar a la alcanzada en el FBR de tanque agitado de 1 L, ambos con el mismo flujo molar de CO₂. Además, el contenido de lípidos fue 68% mayor en comparación con la escala pequeña.

8. PERSPECTIVAS

1. Realizar estudios para determinar el nutriente o condición (e.g. Intensidad luminosa) que limitan el crecimiento de *Neochloris oleoabundans*, ya que al parecer no es el CO₂ el factor limitante.
2. Adaptar a esta microalga a ambientes con concentraciones de CO₂ elevados, elevando periódicamente el flujo molar de CO₂; de esta forma podría utilizarse gases de combustión como fuente de carbono.
3. Evaluar si el crecimiento de *N. oleoabundans* en sistemas abiertos (estanques) también es independiente del flujo molar de CO₂.
4. Realizar evaluaciones de crecimiento y productividad de biomasa de *N. oleoabundans* bajo condiciones mixotróficas, utilizando flujos molares de CO₂ bajos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Kalscheuer, R.; Stolting, T.; Steinbuchel, A., **2006**. Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology*, 152(9): 2529-2536.
2. Gouveia, L.; Oliveira, A. C., **2009**. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(2): 269-274.
3. Mata, T. M.; Martins, A. A.; Caetano, N. S., **2010**. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1): 217-232.
4. Pulz, O.; Scheibenbogen, K., **1998**. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 59: 123-152.
5. Lardon, L.; Hélias, A.; Sialve, B.; Steyer, J.-P.; Bernard, O., **2009**. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology*, 43(17): 6475-6481.
6. Xu, L.; Weathers, P. J.; Xiong, X.-R.; Liu, C.-Z., **2009**. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. *Engineering in Life Sciences*, 9(3): 178-189.
7. Kumar, A.; Ergas, S.; Yuan, X.; Sahu, A.; Zhang, Q.; Dewulf, J.; Malcata, F. X.; van Langenhove, H., **2010**. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. *Trends in Biotechnology*. 28(7): 371-380.
8. Wang, B.; Li, Y.; Wu, N.; Lan, C. **2008**. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79(5): 707-718.
9. Gouveia, L.; Marques, A. E.; Lopes da Silva, T.; Reis, A. **2009**. *Neochloris oleabundans* UTEX #1185: a suitable renewable lipid source for biofuel production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36(6): 821-826.
10. Tornabene, T. G.; Holzer, G.; Lien, S.; Burris, N., **1983**. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleabundans*. *Enzyme and Microbial Technology*. 5(6): 435-440.

-
11. Borowitzka, M. A. **1999**. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. 70: 313-321.
 12. Pulz, O., **2001**. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 287-293.
 13. Mazzuca Sobczuk, T.; García Camacho, F.; Camacho Rubio, F.; Acién Fernández, F.; Molina Grima, E., **2000**. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 67(4): 465-475.
 14. Röttig, A.; Wenning, L.; Bröker, D.; Steinbüchel, A., **2010**. Fatty acid alkyl esters: perspectives for production of alternative biofuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(6): 1713-1733.
 15. Balat, M.; Balat, H. **2010**. Progress in biodiesel processing. *Applied Energy*. 87: 1815-1835.
 16. Chisti, Y. **2007**. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25(3): 294-306.
 17. Knothe, G. **2006**. Analyzing Biodiesel: Standards and Other Methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 83(10): 823-833.
 18. Knothe, G. **2005**. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*. 86(10): 1059-1070.
 19. Knothe, G.; Steidley, K. R. **2005**. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel*. 84(9): 1059-1065.
 20. Avalone, E. A.; Baumeister, T. **1995**. *Manual del Ingeniero Mecánico*. 9a. ed. McGraw-Hill Interamericana. Pág. 982. Vol. I.
 21. Organisation for Economic Co-operation and Development - Food and Agriculture Organization, Biofuels. **2011**. En *Agricultural outlook 2011-2020*; Pp 77-93.

-
22. McCormick, R. L.; Westbrook, S. R. Biodiesel y mezclas de biodiesel. http://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/Q207/q207p_aprmccwes.html (3 de Junio de 2010).
 23. Liu, B.; Zhao, Z. **2007**. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 82(8): 775-780.
 24. Barupal, D.; Kind, T.; Kothari, S.; Lee, D. Y.; Fiehn, O. **2010**. Hydrocarbon phenotyping of algal species using pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry. *BMC Biotechnology*. 10(1): 40.
 25. Blanco, A. M.; Moreno, J.; Del Campo, J. A.; Rivas, J.; Guerrero, M. G. **2007**. Outdoor cultivation of lutein-rich cells of *Muriellopsis* sp. in open ponds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 1259-1266.
 26. Brennan, L.; Owende, P. **2010**. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(2): 557-577.
 27. Band, C. J.; Arredondo-Vega, B. O.; Vazquez-Duhalt, R.; Greppin, H. **1992**. Effect of a salt-osmotic upshock on the edaphic microalga *Neochloris oleoabundans*. *Plant, Cell and Environment*. 15(1): 129-133.
 28. Garibay Hernández, A. **2010**. Evaluación de condiciones de cultivo en la producción de lípidos con el alga *Neochloris oleabundans* y su uso potencial como biodiesel. Tesis de Maestría. IBt – UNAM.
 29. Scott, S. A.; Davey, M. P.; Dennis, J. S.; Horst, I.; Howe, C. J.; Lea-Smith, D. J.; Smith, A. G. **2010**. Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*. 21(3): 277-286.
 30. Ugwu, C. U.; Aoyagi, H.; Uchiyama, H. **2008**. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*. 99(10): 4021-4028.
 31. Lehr, F.; Posten, C. **2009**. Closed photo-bioreactors as tools for biofuel production. *Current Opinion in Biotechnology*. 20(3): 280-285.
-

-
32. Molina Grima, E.; Fernández, F. G. A.; García Camacho, F.; Chisti, Y. **1999**. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *Journal of Biotechnology*. 70(1-3): 231-247.
 33. Goldman, J. C.; Porcella, D. B.; Joe Middlebrooks, E.; Toerien, D. F. **1972**. The effect of carbon on algal growth - Its relationship to eutrophication. *Water Research*. 6(6): 637-679.
 34. Bown, A. W. **1985**. CO₂ and intracellular pH. *Plant, Cell and Environment*. 8(6): 459-465.
 35. Sigeo, D. C., **2005**. *Freshwater Microbiology: Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*. John Wiley & Sons: England.
 36. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **2004**. Apéndice 3: Constantes de disociación de ácidos a 25°C. In *Fundamentos de Química Analítica*, 8° edición ed.; Thomson Learning: México, D.F., Pp. A-10.
 37. Goldman, J. C.; Dennett, M. R.; Riley, C. B. **1982**. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgal cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 24: 619-631.
 38. Satoh, A.; Kurano, N.; Miyachi, S., Inhibition of photosynthesis by intracellular carbonic anhydrase in microalgae under excess concentrations of CO₂. *Photosynthesis Research* **2001**, 68, (3), 215-224.
 39. Raven, J. A.; Beardall, J. **2003**. Carbon Acquisition mechanisms of algae: carbon dioxide diffusion and carbon dioxide concentrating mechanisms. En *Advances in photosynthesis and respiration*, Larkum, A. W. D.; Douglas, S. E.; Raven, J. A., Eds. Kluwer Academic Publishers: Holanda; Vol. 14.
 40. Spalding, M. H. **2008**. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transporters. *J. Exp. Bot.* 59(7): 1463-1473.
 41. Moroney, J. V.; Somanchi, A. **1999**. How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation? *Plant Physiol.* 119(1): 9-16.

-
42. Shuler, M. L.; Kargi, F. **2002**. Scale-up and its difficulties. En *Bioprocess engineering: Basic Concepts*, 2° ed.; Pp. 286-305.
 43. Sánchez Mirón, A.; Contreras Gómez, A.; García Camacho, F.; Molina Grima, E.; Chisti, Y. **1999**. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*. 70(1-3): 249-270.
 44. Sousa, C.; de Winter, L.; Janssen, M.; Vermuë, M. H.; Wijffels, R. H. **2012**. Growth of the microalgae *Neochloris oleoabundans* at high partial oxygen pressures and sub-saturating light intensity. *Bioresource Technology*. 104: 565-570.
 45. Rosello Sastre, R.; Csögör, Z.; Perner-Nochta, I.; Fleck-Schneider, P.; Posten, C. **2007**. Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors - A conceptual approach. *Journal of Biotechnology*. 132(2): 127-133.
 46. Gatenby, C. M.; Orcutt, D. M.; Kreeger, D. a.; Parker, B. C.; Jones, V. A.; Neves, R. J. **2003**. Biochemical composition of three algal species proposed as food for captive freshwater mussels. *Journal of Applied Phycology*. 15(1): 1-11.
 47. Vonshak, A. **1986**. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En *Handbook of microalgal mass culture*, Richmond, A., Ed. CRC Press; Pp. 117-145.
 48. Box, G.; Hunter, W.; Hunter, J. **1999**. Métodos de superficies de respuesta. En *Estadística para investigadores: Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*, Reverté ediciones: México, D.F.; Pp 525-541.
 49. Myers, R. H.; Montgomery, D. C. **1995**. *Response Surface Methodology: Process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons, Inc.: EEUU.
 50. Mandenius, C.; Brundin, A. **2008**. Review: Biocatalysts and bioreactor design. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Prog.* 24: 1191-1203.
 51. Band-Schmidt, D., **1997**. Generación biotecnológica para la producción de microalgas. *Ciencias y Mar*. 23-30.
-

-
52. Vázquez-Duhalt, R.; Greppin, H. **1987**. Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochemistry*. 26: 885-889.
 53. Kates, M. **1986**. *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. 2° ed.; Elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam.
 54. *Thermo Scientific Pierce GC and HPLC technical handbook*. **2008**.
 55. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J., **1951**. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265-275.
 56. Chaplin, M. **1994**. Monosaccharides. En *Carbohydrate analysis: a practical approach*. , Chaplin, M. F.; Kennedy, J. F., Eds. IRL Press Ltd; Pp 1-2.
 57. Becker, E. W., **1994**. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press: NY; Pág. 293.
 58. Pruvost, J.; Van Vooren, G.; Cogne, G.; Legrand, J. **2009**. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresource Technology*. 100(23): 5988-5995.
 59. Ritchie, R. J., **2006**. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynthesis Research*. 89(1): 27-41.
 60. Lopes da Silva, T.; Reis, A.; Medeiros, R.; Oliveira, A.; Gouveia, L. **2009**. Oil production towards biofuel from autotrophic microalgae semicontinuous cultivations monitored by flow cytometry. *Applied biochemistry and biotechnology*. 159(2): 568-578.
 61. Molecular Probes SYTO Red fluorescent nucleic acid stains. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp11340.pdf> (Consultada el 23 de marzo de 2012).
 62. Popovich, C. A.; Damiani, C.; Constenla, D.; Martínez, A. M.; Freije, H.; Giovanardi, M.; Pancaldi, S.; Leonardi, P. I. **2012**. *Neochloris oleoabundans* grown

-
- in enriched natural seawater for biodiesel feedstock: Evaluation of its growth and biochemical composition. *Bioresource Technology*. 114(0): 287-293.
63. Matsuda, Y.; Colman, B. **1996**. Active uptake of inorganic carbon by *Chlorella saccharophila* is not repressed by growth in high CO₂. *Journal of Experimental Botany*. 47(305): 1951-1956.
64. Tang, D.; Han, W.; Li, P.; Miao, X.; Zhong, J. **2011**. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*. 102(3): 3071-3076.
65. Li, Y.; Horsman, M.; Wang, B.; Wu, N.; Lan, C. Q., **2008**. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied microbiology and biotechnology*. 81(4): 629-636.
66. Levine, R. B.; Costanza-Robinson, M. S.; Spatafora, G. A. **2011**. *Neochloris oleoabundans* grown on anaerobically digested dairy manure for concomitant nutrient removal and biodiesel feedstock production. *Biomass and Bioenergy*. 35(1): 40-49.
67. Murray, K. E.; Healy, F. G.; McCord, R. S.; Shields, J. A. **2011**. Biomass production and nutrient uptake by *Neochloris oleoabundans* in an open trough system. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(1): 89-95.
68. Muradyan, E. A.; Klyachko-Gurvich, G. L.; Tsoglin, L. N.; Sergeyenko, T. V.; Pronina, N. A. **2004**. Changes in lipid metabolism during adaptation of the *Dunaliella salina* photosynthetic apparatus to high CO₂ concentration. *Russian Journal of Plant Physiology*. 51(1): 53-62.
69. Garibay Hernández, A.; Vázquez Duhalt, R.; Sánchez Saavedra, M. d. P.; Serrano Carreón, L.; Martínez Jiménez, A. **2009**. Biodiesel a partir de microalgas. *Bioteconología y Bioingeniería. Publicación de la Sociedad Mexicana de Bioteconología y Bioingeniería A.C.* 13(3): 38-61.
70. Benemann, J. R. **2000**. Hydrogen production by microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 12(3): 291-300.
-

71. Hallenbeck, P. C.; Benemann, J. R. **2002**. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 27(11-12): 1185-1193.
72. Becker, E. W. **2007**. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25(2): 207-210.
73. Hosikian, A.; Lim, S.; Halim, R.; Danquah, M. K. **2010**. Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering*. 2010.
74. Richmond, A. **2004**. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycolgy. Blackwell Science. Oxford.
75. Andreozzi, R.; Caprio, V.; Ciniglia, C.; de Champdoré, M.; Lo Giudice, R.; Marotta, R.; Zuccato, E. **2005**. Antibiotics in the environment: occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. *Environmental Science & Technology*. 39(20): 8112-8112.
76. Pan, X.; Deng, C.; Zhang, D.; Wang, J.; Mu, G.; Chen, Y. **2008**. Toxic effects of amoxicillin on the photosystem II of *Synechocystis* sp. characterized by a variety of in vivo chlorophyll fluorescence tests. *Aquatic Toxicology*. 89(4): 207-213.

10. APÉNDICE

10.1 Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d)

Bajo un régimen típico de crecimiento de un cultivo en lote (sistema cerrado), donde el suplemento de nutrientes es limitado y no se alimenta nada del exterior, el crecimiento algal atraviesa diferentes fases:

1. Adaptación (fase lag o de crecimiento retardado);
2. Fase de crecimiento acelerado;
3. Crecimiento exponencial (fase log);
4. Crecimiento log decreciente;
5. Fase estacionaria;
6. Muerte acelerada;

Después de un corto periodo de preparación (fase 1), donde las células se adaptan a las condiciones de cultivo, las células entran a la fase de crecimiento exponencial (log). En esta fase, para calcular la velocidad específica de crecimiento (μ), valor específico para cada organismo y medio de cultivo, se utiliza la ecuación:

$$\ln M_f = \mu t + \ln M_i$$

donde M_f es la concentración final de masa celular o densidad celular (número de células), t es el tiempo y M_i es la concentración inicial de masa celular o densidad celular. Al graficar $\ln M_f$ con respecto al tiempo, el valor de la pendiente corresponde a la μ ⁵⁵.

El tiempo de duplicación (t_d) puede ser calculado mediante la ecuación⁵⁵:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

10.2 Densidad celular

Es el número de células por unidad de volumen (células/mL) presentes en un cultivo microalgal. El **Δ Densidad celular** es el incremento en la densidad celular de un cultivo durante los 7 días de cultivo.

La densidad celular inicial se calculó mediante el número de células al inicio del cultivo y un promedio obtenido de 4 inóculos independientes, preparados de la misma forma que los utilizados para los cultivos en FBR, pero utilizados sólo para pruebas bioquímicas.

10.3 Producción

Es la masa de producto (peso seco, lípidos, carbohidratos, proteínas, pigmentos) formada en un periodo de tiempo determinado (t); está dada en g_{producto}/L y se calcula mediante la expresión:

$$\Delta\text{Producto} = \text{Producto}_t - \text{Producto}_{\text{inicial}}$$

Donde: $\text{Producto}_{\text{inicial}}$ se refiere a la concentración de producto al inicio del cultivo; Producto_t es la concentración de producto en el cultivo al tiempo t y $\Delta\text{Producto}$ se refiere al producto formado durante la totalidad del periodo de incubación, de manera tal que $\text{Producto}_t = \text{Producto}_{\text{Final}}$.

10.4 Productividad

La productividad (Q_{Producto}) es la velocidad de formación de producto (peso seco, lípidos, carbohidratos, proteína, pigmentos); está dada en $g_{\text{Producto}}/L/\text{día}$. Se calcula mediante la ecuación:

$$Q_{\text{Producto}} = \frac{\Delta\text{Producto}}{t}$$

Donde: $\Delta\text{Producto}$ (g_{Producto}/L) es la cantidad de producto formado durante el periodo de cultivo (t).

10.5 Flujo molar de CO_2

El flujo molar de CO_2 fue calculado con la Ley del gas ideal, donde se considera que un mol de gas equivale a 22.4 L (1 atm). De esta forma:

$$\text{Flujo molar de } CO_2 \left(\frac{mmol \text{ } CO_2}{L \cdot \text{min}} \right) = \frac{\text{Flujo total de gas (vvm)}}{22.4} \times \frac{\% \text{ de } CO_2}{100} \times 1000$$

10.6 Cinéticas de oxígeno disuelto

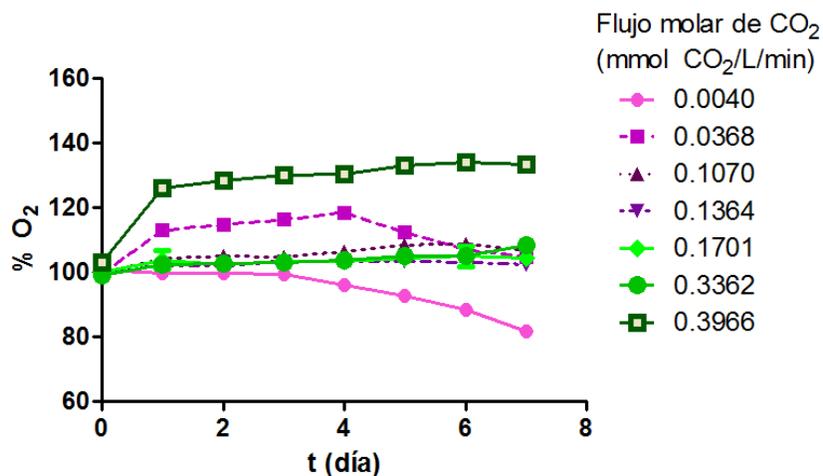


Figura 22. Cinéticas de O₂ disuelto (en porcentaje con respecto a la saturación) de los cultivos evaluados en el diseño experimental hexagonal.

10.7 Cinéticas de CO₂ disuelto

Las mediciones no pudieron realizarse en algunos cultivos por problemas de medición con el electrodo.

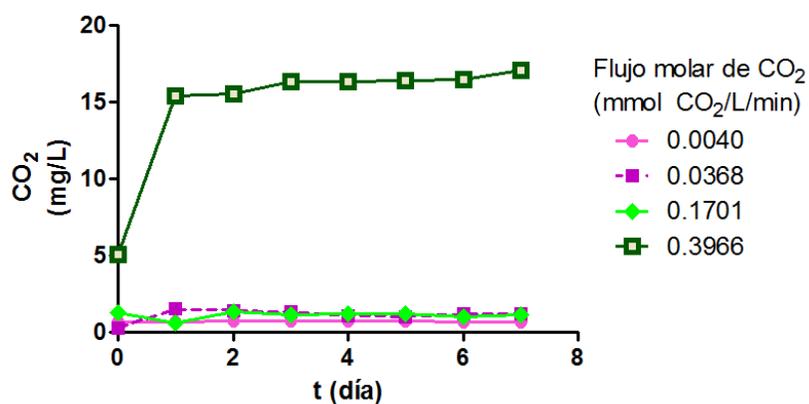


Figura 23. Cinéticas de CO₂ disuelto de algunos cultivos evaluados en el diseño experimental hexagonal.

10.8 Comparación de los resultados obtenidos con reportes en la literatura. Donde P_x y P_{Lip} , son la productividad de peso seco y lipídica, respectivamente y t_d es el tiempo de duplicación.

Medio de cultivo	Tipo de FBR	T (°C)	pH	Intensidad luminosa	Flujo molar de CO ₂ (mmol/L/min)	[Nitrato] inicial	P_x (mg/L/día)	P_{Lip} (mg/L/día)	% Lípidos (g _{Lip} /g _{DCW} ×100)	t_d (día)	Ref.
BBM (Medio Basal de Bold)	Tanque agitado (lote)	25	7.0	50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (24:0)	0.0040	2.94 mM	88.28	24.96	28	0.74	a
BBM		25	7.0	50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (24:0)	0.1701	2.94 mM	90.94	26.85	30	0.79	a
BBM (columna de burbujeo)	Columna de burbujeo (CB) (lote)	25	7.0	50 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (24:0)	0.1701	2.94 mM	76.12	38.29	50	0.84	a
Extracto de suelo modificado	CB con agitador magnético (lote)	30 ± 2	–	360 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (24:0)	1.1161	10 mM	630	98	16	–	65
Extracto de suelo modificado		30 ± 2	–	360 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (24:0)	1.1161	5 mM	400	133	34	–	65
BBM	Frascos con agitador magnético (lote)	25	–	100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (24:0)	0.8929	2.94 mM	50.51	23.57	50	–	28
BBM		25	–	100 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (24:0)	0.0313	0.6 mM	45.91	19.70	44	–	28
BBM 3N3S	Airlift de panel plano (continuo)	25	7.5	270 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$	0.0086 (pulsos de CO ₂ para control de pH)	8.82 mM	550	126.67	23	–	58
Bristol (mineral)	CB (lote)	30	–	150 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$	0.2009	2.94 mM	150	37.66	29	1.4	9
BBM modificado	Matraz (lote)	23-25	7.2	200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (14:10)	1.4286-2.1429	100 mg/L	158	8.9	–	–	66

10.8 Comparación de los resultados obtenidos con reportes en la literatura (continuación).

Medio de cultivo	Tipo de FBR	T (°C)	pH	Intensidad luminosa	Flujo molar de CO ₂ (mmol/L/min)	[Nitrato]	P _x (mg/L/día)	P _{Lip} (mg/L/día)	% Lípidos (g _{Lip} /g _{DCW} ×100)	t _d (día)	Ref.
Efluente digerido anaeróbicamente	Matraz (lote)	23-25	–	200 µE/m ² /s (14:10)	1.4286-2.1429	60.14 mg/L	88.3	2.57	–	–	66
BG11 (Blue-Green 11)	Abrevadero (lote)	21.5	8.0	147 µE/m ² /s (12:12)	0.0043	12.9 mM	38.77	–	–	4.6	67
BG11	Abrevadero (lote)	21.6	6.6	147 µE/m ² /s (12:12)	0.2255	12.9 mM	42.82	–	–	4.4	67
BG11	Abrevadero (lote)	22.3	6.6	147 µE/m ² /s (12:12)	0.4509	12.9 mM	29.23	–	–	1.9	67
BG11	Abrevadero (lote)	22.6	6.5	147 µE/m ² /s (12:12)	0.6764	12.9 mM	40.91	–	–	3.6	67
BG11	Abrevadero (lote)	23.4	6.9	147 µE/m ² /s (15:9)	0.4509	12.9 mM	28.15	–	–	4.8	67
	Abrevadero (lote)	23.2	6.6	147 µE/m ² /s (15:9)	0.6764	12.9 mM	40.42	–	–	3.6	67
SWES (Agua de mar + extracto de suelo + sales)	Matraz (lote)	25-26	8.0	168 µE/m ² /s (16:8)	0.0744-0.1042	3.5 mM	23.33	18.25	14.82	0.98	62
BBM	– (lote)	28-31		3000 lux (24:0)	Aire con 1% CO ₂	0.5 mM	–	–	35-54%	–	10

10.9 Comparación de la densidad celular alcanzada a 25 y 29 °C.

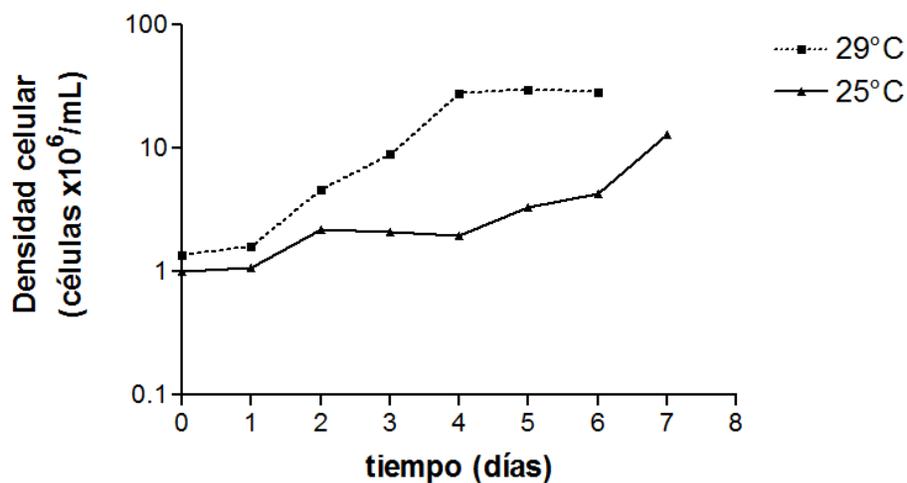


Figura 24. Cinéticas de crecimiento de *N. oleoabundans* a 25 y 29 °C.
0.5 vvm con 2.51% de CO₂, pH 7, antibiótico.

10.10 Cartel presentado en el XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y con el cual se obtuvo el premio a mejor cartel expuesto el 23 de Junio de 2011.